



TITLE:

エマルション注射剤による制癌剤  
のリンパ移行性改善に関する研究(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

橋田, 充

---

CITATION:

橋田, 充. エマルション注射剤による制癌剤のリンパ移行性改善に関する研究. 京都大学, 1979, 薬学博士

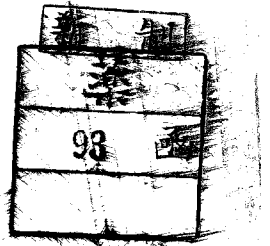
ISSUE DATE:

1979-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k2223>

RIGHT:



エマルション注射剤による制癌剤  
のリンパ移行性改善に関する研究

橋 田 充

# エマルション注射剤による制癌剤 のリンパ移行性改善に関する研究

橋 田 充

# 目 次

総 論 の 部 .....	1
緒 言 .....	1
第Ⅰ章 リンパ移行性改善とその機構に関する基礎的検討 .....	2
1-1 剤形の選択とリンパ移行実験法 .....	3
1-a エマルションの選択と調製法 .....	3
1-b ラットを用いたリンパ移行実験法 .....	5
1-c 考 察 .....	8
1-2 ラット大腿伸筋に注射後の油脂およびモデル薬物の移行 .....	9
2-a 油脂の移行 .....	9
2-b モデル薬物の移行 .....	13
2-c 組織学的検討 .....	16
2-d 考 察 .....	17
1-3 ラット胃壁に注射後の油脂およびモデル薬物の移行 .....	18
3-a 油脂の移行 .....	18
3-b モデル薬物の移行 .....	20
3-c 薬物のリンパ節における動態 .....	23
3-d 考 察 .....	26
1-4 油中微粒子型エマルションによる5-fluorouracilのリンパ移行性改善 .....	28
4-a 大腿伸筋に注射後の移行 .....	28
4-b 胃壁に注射後の移行 .....	31
4-c 代謝に対する影響 .....	35
4-d 考 察 .....	36
第Ⅱ章 油中微粒子型エマルションの物理化学的性質とリンパ移行 増大効果との関連 .....	38
Ⅱ-1 油中微粒子型エマルションの製剤学的特性 .....	39
1-a 粒度分布および安定性 .....	39
1-b 薬物放出速度 .....	41
1-c 考 察 .....	42

Ⅱ-2	油脂のリンパ移行に及ぼす剤形の物理化学的性質の影響	44
2-a	油脂の移行に及ぼす注射容量の影響	44
2-b	注射部位の機械的圧迫の影響	48
2-c	油脂の移行と物理化学的性質との関連	49
2-d	考 察	52
第Ⅲ章	油中微粒子型エマルジョンの臨床応用に関する検討	53
Ⅲ-1	家兎リンパ節転移モデルに対する治療効果	54
1-a	リンパ節転移モデル作製法および実験法	54
1-b	bleomycinの生体内移行	56
1-c	リンパ節転移に対する抗腫瘍効果	61
1-d	考 察	62
Ⅲ-2	小児リンパ管腫に対する治療効果	64
2-a	bleomycin含有油中微粒子型エマルジョンの小児リンパ管腫に対する臨床効果	64
2-b	リンパ管腫縮小の機構	66
2-c	考 察	67
結 論		68
謝 辞		70
実 験 の 部		71
第Ⅰ章	実験の部	71
第Ⅱ章	実験の部	75
第Ⅲ章	実験の部	77
引 用 文 献		79

# 総 論 の 部

## 緒 言

近年、医学・薬学の発展にともない、生理活性が強くその一方で副作用発現の危険性も高い新薬が次々と開発されている。従ってこれらの薬物を有効に用いるためには、薬物投与をさらに精密化する必要があると考えられる。こうした観点から、生物薬剤学領域においても、従来の剤形の概念を拡大し積極的に薬物を目的臓器に送り込むことを目指した製剤学的修飾法すなわち drug delivery system の開発が試みられている。<sup>1), 2), 3)</sup>

現在臨床で用いられている薬物の中でも、制癌剤は細胞毒性を作用機作としているため強い副作用を示すものが多く、薬物投与の精密化が望まれる代表的な例ということができる。従って、その毒性を腫瘍部位に集中させ制癌作用の増強と副作用の軽減を達成しようとする試みが基礎・臨床を通じて多数報告されている。<sup>4), 5)</sup> 中でも、癌の予後を支配する転移・再発のかなりの部分がリンパ系を介して起こることから、<sup>6)</sup> 制癌剤をリンパ系に送り込むことの有用性が注目され、制癌剤を直接リンパ管内に注入する試みが行われているが、<sup>7), 8), 9)</sup> 手技が繁雑で、解剖学的に注入不可能な部位も多いことから、一般化されるに至らずこれに替わる簡便で効果的な投与方法の開発が望まれている。しかしながら、臓器からリンパ系への物質の移行に関しては生理学的にも不明な点が多く、実験法を含めて検討すべき課題が多く残されているため、そのような試みに成功した例は見当たらない。

著者は、制癌剤のリンパ移行性を改善することのできる製剤学的修飾法の開発を試み、油中水型エマルジョンを改良した油中微粒子型エマルジョンが制癌剤をリンパ系に高濃度に移行させることを基礎実験より確かめ、さらに臨床応用に関しても検討を加えて、その有用性を明らかにした。また、物質のリンパ移行における生理学的あるいは物理化学的支配因子の解明に必要な基礎的知見をも得ることができた。

以下これらの結果について三章にわたり論述する。

## 第Ⅰ章 リンパ移行性改善とその機構に関する 基礎的検討

リンパ系は血管系と共に循環系を構成し、体液循環の調節、組織中老廃物の除去、生体免疫等に重要な役割を果たしている<sup>10)</sup>。また、消化管より吸収された脂質<sup>11)</sup>、種々の器官で産生されたホルモン<sup>12), 13)</sup>、酵素<sup>14), 15)</sup>など生体機能を維持する上で重要な物質の流路としての役割も見逃すことはできない。薬物治療の立場からも、末梢リンパ液が採取し得る体液の内で最も組織中の細胞外液の組成を反映していると考えられることから<sup>10)</sup>、リンパ液中薬物濃度が重要視されている。しかしながらその手技の繁雑性のためリンパ液中の薬物濃度を測定した報告は少なく、しかもその大部分は体内分布臓器の一つ<sup>16), 17)</sup>あるいは消化管吸収にともなう移行経路の一部<sup>18), 19)</sup>としてリンパ系を取り扱ったものに限られており、組織間隙中へ注射された薬物のリンパ系への直接移行を系統的に検討した報告はほとんど見当たらない。

本研究で目的とする、制癌剤のリンパ移行性改善を意図した製剤学的修飾法の開発を行うためには、薬物のリンパ移行を正確に把握することが必要条件となるが、そのためには手技が確実で客観的・定量的な評価実験法を確立することが必要である。こうした観点から、著者は最も一般的で取り扱い易い実験動物であるラットを用いたリンパ移行評価法を確立し、種々の基礎実験を行った。

本章では、剤形の選択の経緯とラットを用いた基礎実験法設定に関する基本的考えならびにこれらを用いて行った実験の結果について論述する。

## I-1 剤形の撰択とリンパ移行実験法

組織間隙中からリンパ系への物質の移行には、生体側の生理学的要因と物質の持つ物理化学的要因の両方が複雑に関与していると考えられる。生体側の要因について考えると、組織間隙から毛細リンパ管への物質の侵入の過程においては、毛細リンパ管の微細構造と、リンパ生成の機構に関連した末梢での体液の移動がその支配因子として大きな影響を与えていると考えられる。一方毛細リンパ管へ侵入後の物質の移行はリンパ流に随行すると考えられ、また個体レベルでのリンパ系の形態学的走行に従った動態を示すことが予想される。従って、本研究において制癌剤をリンパ系へ送り込む剤形を選択し、あるいは制癌剤のリンパ移行評価法を設定するためにはこうしたリンパ系の生理学的特性に関する基礎的検討が不可欠と考えられる。

以上の観点から、本研究に用いた剤形および評価法の選択について論述する。

### 1-a エマルションの選択と調製法

動物の各臓器の細胞は、毛細血管の動脈側より濾出した血漿由来の液状成分、いわゆる組織液によって栄養成分や酸素の補給を受け、また逆に老廃物の回収もこれに依存している。これら細胞由来の老廃物を含む組織液が血流に戻る過程には二つの経路、すなわち組織から毛細血管の静脈側へ直接吸収される経路と、毛細リンパ管に吸収されリンパ系を経由して静脈流に到達する経路が存在する。従って組織間隙中の物質はこの二つの経路のいずれかによって組織より除去される訳であるが、いずれの経路をとるかは一様ではなく、両脈管系の生理学的あるいは形態学的特性との関連により決まるものと考えられる。

毛細血管は形態学的には互いに密着し合った内皮細胞より成り、連続的な基底膜を持っている<sup>20)</sup>。従って水および物質の移動は小孔を介して行われるものと想像されている。種々の異った分子量を持つ dextran をトレーサーとして毛細血管壁の透過性を調べた報告<sup>21), 22)</sup>によると、小孔の直径は約 40 Å と推定され、これ以外に巨大分子を通過させる通路の存在も知られているが、<sup>23), 24)</sup>その存在頻度は極めて低いと考えられている。従って毛細血管壁は水および低分子物質のみを効率よく通過させ、高分子物質の通過には抵抗を示すと考えられる。これに対して毛細リンパ管壁は、毛細血管壁よりも遙かに大きい一層の内皮細胞より成り、基底膜を欠いている。<sup>25), 26)</sup>しかも内皮細胞間の接合部の間隙も広く、一部の内皮細胞間には開いて数ミクロンにも及ぶ空隙を形成している。従って毛細リンパ管壁はこの内皮細胞空隙を介して、水や低分子のみならず、高分子物質や巨大粒子まで比較的自由に通過させると考えられている。こうした両脈管系の微細構造の違いにより、組織間隙中に存在する物質のうち、蛋白質等の高分子物質はリンパ系に選択的に吸収される。一方、水やブドウ糖、アミノ酸などの低分子物質は両方の経路で吸収されるが、両脈管系の流量を比較すると血流の方が遙かに勝るので、実質的にはほぼ全量が血管系に吸収されると考えられる。<sup>27)</sup>また組織中に注射された物質の吸収経路と分子量の間にもこうした関係が得られることを Ballard<sup>28)</sup>は報告している。



現在臨床で用いられる制癌剤の大部分は水溶性で分子量も小さい。従って、これらの制癌剤を注射しても上記の機構で血管系に大部分が吸収されると予想され、これをリンパ系に高濃度に移行させるには、何らかの製剤学的修飾を施すことが必要と考えられる。本研究においては、両脈管系の微細構造の差異に着目し、制癌剤をリンパ系へ選択的に運び込むことのできる剤形の開発を試みた。

組織間隙中からリンパ管に選択的に取り込まれる物質として、先にあげた蛋白質等生体高分子以外に、Chinese ink や Indian ink などの色素粒子、<sup>(29), (30)</sup> 金コロイド、<sup>(31), (32)</sup> あるいは油脂滴<sup>(33), (34)</sup> などが報告され、これらを運搬体として利用することにより制癌剤にリンパ指向性を与えることが可能になると考えられる。本研究では注射剤としての安全性および剤形としての一般性の問題を考慮して、油滴を運搬体として選びゴマ油を基剤とする各種剤形の効果を検討した。

ゴマ油を基剤とする水溶性制癌剤の剤形としては、油性懸濁液と各種エマルションが考えられる。制癌剤を油に分散させた油性懸濁液の場合に油滴が運搬体として毛細リンパ管に入るためには直径が数ミクロン程度になる必要があり、従って薬物はさらに微粒子化される必要がある。製剤技術的にみてこのことは必ずしも容易でなく、<sup>(35)</sup> また後述するようにこの剤形では油滴のリンパ移行性に劣ることから、エマルションを剤形として選んだ。

エマルションは互いに混じり合わない二つの液体の一方を他方中に分散させたもので、二液体が水と油の場合には水中油 (O/W) 型と油中水 (W/O) 型の二種類が調製できる。<sup>(36)</sup> O/W型エマルションを水溶性制癌剤の剤形として用いる場合には、制癌剤が連続相である水相中に溶解しているので何らかの方法により薬物を油滴に吸着させなければ、油滴を運搬体とすることはできない。これに対して W/O型エマルションにおいては、薬物は内部の水相に溶けて存在し、油滴の移行に付随して移動すると予想され、以上の剤形を通じて最も本研究の目的にかなった剤形と考えられる。従って本研究では W/O型エマルションを基本の剤形として選択し、さらにエマルション製剤における不安定性の問題を改善する目的で、W/O型エマルションの内部の水滴をゼラチンゲルより成る微粒子とした新しい剤形、油中微粒子 (sphere in oil) (S/O) 型エマルションを考案した。<sup>(37)</sup> 薬物はゼラチンゲル中を水中と同様に自由に拡散できるので、<sup>(38)</sup> ゼラチンと相互作用を持つ特殊な薬物の場合を除くと、W/O型エマルションと S/O型エマルションは本質的に同一の系と考えられるが、これら両エマルションの物理化学的性質については第Ⅱ章で検討する。

Table 1 には、S/O型エマルションおよび W/O型エマルションの標準処方を書いた。基剤にはゴマ油、乳化剤としては sorbitan sesquioleate (SO-15) と硬化ヒマシ油 polyoxyethylene 誘導体 (HCO-60) を用いた。また S/O型エマルション調製には内相に 20% (W/V) ゼラチン水溶液を用いた。ゴマ油、SO-15、ゼラチンは第九改正日本薬局方に収載され、HCO-60 も医薬品添加物として許可されていることから、安全性を考慮してこれらの材料を選んだ。

臨床で用いられる制癌剤はそれぞれ、分布、代謝、および排泄などに特性を持ち異なった生体内挙動を示すことが知られている。<sup>(39)</sup> これらの特性は剤形の評価に複雑な要因を持ち込み客観的・定量的評価を困難にさせることが予想される。従って、本研究において、剤形の評価に用いるモデル薬物は分子量が小さく水溶性が高いという基本条件以外に、次のような条件を満たすことが望ましい。(1) 生体内で活性を示さない。(2) 化学的に安定である。(3) 生体内挙動が単純で体内からの消失が速い、および(4) 測定感度が高い。本

Table 1. Composition of W/O Emulsion and S/O Emulsion.

W/O Emulsion		S/O Emulsion	
Water Phase	0.35 ml	Water Phase	0.35 ml
Anticancer Agent		Anticancer Agent	
Distilled Water	q. s.	Gelatin	70 mg
Oil Phase	2.0 ml	Distilled Water	q. s.
Sesame Oil	1.84 ml	Oil Phase	2.0 ml
SO-15	0.13 ml	Sesame Oil	1.84 ml
HCO-60	0.03 ml	SO-15	0.13 ml
Total Volume	2.35 ml	HCO-60	0.03 ml
		Total Volume	2.35 ml

研究ではこれらを満たすモデル薬物として、腎機能検査に用いられる sodium o-iodo hippurate(<sup>131</sup>I) (hippuran) を選び、その実験の結果を制癌剤 5-fluoro uracil (5-FU) を用いた実験の結果と併わせて剤形の評価に用いた。また運搬体となる油滴の移行を調べるためにゴマ油の成分の一つである tripalmitin を<sup>14</sup>Cでラベルしたものをゴマ油に溶かし、トレーサーとして用いた。

### 1-b ラットを用いたリンパ移行実験法

組織における体液循環の調節に関しては、Guyton<sup>40), 41)</sup>あるいはWiederhielm<sup>42)</sup>らがそれぞれの立場でシミュレーション模型を提唱しているが、いずれにしても毛細血管内圧、組織間隙の内圧、および毛細リンパ管内圧と血漿、組織間液、およびリンパの膠質浸透圧のそれぞれの作用の結果、組織間液が毛細リンパ管に流入し、リンパが作られると考えられている。リンパは毛細リンパ管からリンパ管へと流れるが、この流れは筋運動、呼吸変化、および血管の拍動など外部の力、あるいはリンパ管壁自身の能動的な収縮によって推進されると考えられる<sup>43)</sup>。またリンパ管の途中にある弁構造の働きにより、リンパは常に一方に流れるように調節されており、薬物のリンパ移行にもこの特性が大きな影響を与えているものと思われる。リンパはリンパ節において他の部位から流出したリンパと合流を重ね、胸管のような中心リンパ管を経て最終的には左右の鎖骨下静脈角より静脈に注ぐので、薬物のリンパ移行を解析するためには、末梢からこの段階までを総合的に把えた考察が必要である<sup>44)</sup>。

本研究で目的とするように、注射された薬物のリンパ系への移行量を測定するには、注射部位にできるだけ近い末梢リンパ管にカニューレを施し、末梢リンパを全量集めて定量する方法が最も適当と考えられる。しかしながら、末梢リンパ管にカニューレを施した報告は、人<sup>45)</sup>、羊<sup>46)</sup>、犬<sup>47)</sup>、猫<sup>48)</sup>、および家兎<sup>49)</sup>のように中程度以上の動物には見られるが、ラットのような小動物の細い末梢リンパ管ではそうした報告は見当たらない。従ってラットを用いて物質のリンパ移行を調べた従来の報告は次の三通りの実験方法のいずれかを用いている。(1)リンパ節を摘出し、リンパ節中濃度を測定する<sup>29)</sup>(2)胸管にカニューレを施し、経時

的に胸管リンパを採取して定量する。<sup>50), 51), 52)</sup> (3) 胸管を結紮し、血中濃度の変動からリンパ系の寄与を推測する。<sup>53)</sup> しかしながら、組織間隙中からリンパ系への薬物の移行を定量的に追跡するには、これらの方法はそれぞれ不備な点が多い。すなわち、(1)の方法では一匹のラットから1つの結果しか得られず経時的变化もとらえにくい。従ってこの方法はコロイド粒子のようにリンパ節に蓄積する物質以外に対しては適当でないと考えられる。(2)の方法ではリンパ系へ移行した物質を全量、しかも経時的に採取し測定することが可能であるが、胸管には多くの部位のリンパが集まるため、投与部位から直接リンパ行性に移行した物質と循環血流から各臓器を経てリンパに移行した物質の区別がしにくい欠点がある。事実、一般の薬物では、胸管リンパ中濃度と血漿中濃度との間に密接な関連があることが知られている。<sup>54)</sup> (3)の方法では、胸管を結紮することにより、浮腫の発生など体液調節に大きな障害が出ることが予想され、また定量的取り扱いもむずかしい。

著者は以上のような実験方法に関する問題点を考慮して、動物全体をリンパ系に主眼を置いて数個のコンパートメントに分け、各コンパートメント中の薬物量を実験的に測定することによって、薬物のリンパ移行の動態を解析した。Fig. 1は本研究で用いた、製剤学的修飾を施して注射された薬物のリンパ移行模式図である。図に示したように、ある部位に運搬体と共に注射された薬物は、運搬体に付随して、あるいは

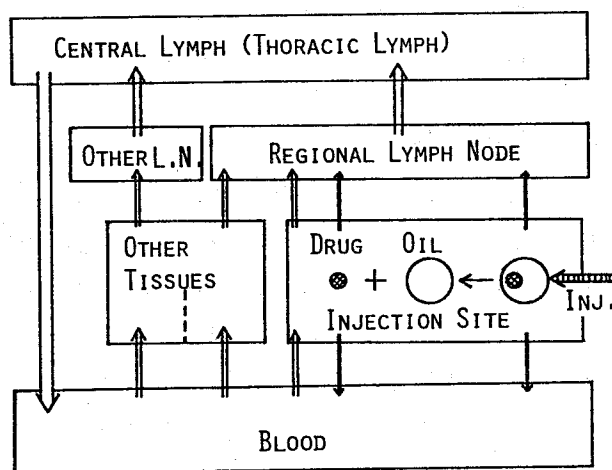


Fig. 1. Schematic diagram of a model of drug transfer following injection with emulsion formulations.

は注射部位において遊離した後、リンパ系あるいは血管系へ移行する。注射部位を下半身とすると、注射部位から出たリンパは胸管を経て静脈に注ぐので、胸管リンパを中心リンパとみなすことができる。また注射部位の所属リンパ節は末梢リンパを代表すると考えられる。こうして、注射部位→所属リンパ節→胸管→循環血流というリンパの流れを基本としたモデルを構築した。一方、各臓器には常に循環血流からの組織液の補給があるので、循環血流からリンパ系への薬物の移行を考慮し、また循環血流は循環速度が速いので一つのコンパートメントとみなした。こうして、注射部位、所属リンパ節、胸管および循環血流

の4つの主要コンパートメントと、比較のための他臓器およびその所属リンパ節に相当するコンパートメントから成る生体移行モデルを考え、各コンパートメント間の薬物動態の比較からリンパ移行量の推定と剤形の評価を行った。また運搬体である油滴の移行を同様の方法で追跡し、薬物移行との比較から、その機構の解明を試みた。

実際の実験では、ラットの大腿伸筋と胃を注射部位として選んだ。前者は筋肉注射実験のモデル注射部位として実験方法も確立され、また左右両足が比較できるという長所を有している。後者は臨床における有用性を検討する目的で消化器の代表として選んだ。ラットのリンパ系解剖はJob<sup>55)</sup>によってそのあらましが記され、近年さらにTilney<sup>56)</sup>によって体表部および内臓からのリンパの流れとリンパ節の帰属が詳細に検討されている。著者はTilneyの報告を色素を注入して確認し、大腿伸筋および胃壁からのリンパの流路をFig. 2およびFig. 3のように確定した。そして大腿伸筋の所属リンパ節として腸骨リンパ節 (iliac

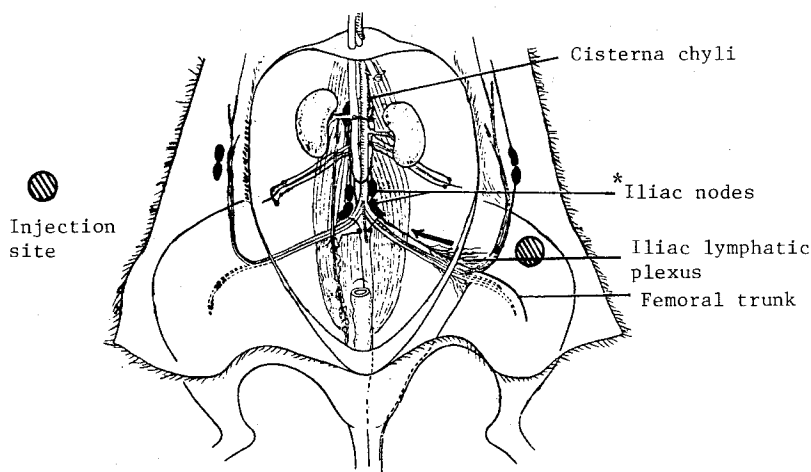


Fig. 2. Route of lymphatic drainage from the thigh muscle.

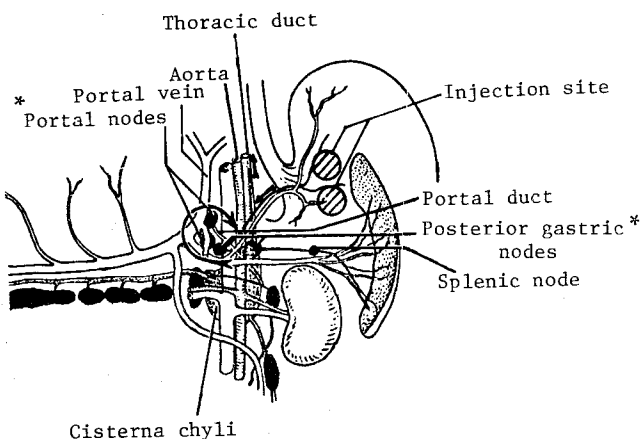


Fig. 3. Route of lymphatic drainage from the stomach.

lymph node)を、胃壁の所属リンパ節として門脈リンパ節(portal lymph node)と後胃リンパ節(posterior gastric lymph node)を用いた。ラットの胸管リンパを採取する方法には、左鎖骨下静脈角に捜管する Saldeen と Linder<sup>57)</sup>の方法と横隔膜下の胸管に挿管する Bollman らの方法<sup>58)</sup>があるが、本研究では手技の確実な後者を用いた。

## 1-c 考 察

リンパ系の生理学的・形態学的諸特性を検討し、制癌剤にリンパ指向性を付与する剤形を選択すると共に、ラットを用いた評価実験法を考案した。剤形は、リンパ指向性・剤形としての一般性、および安全性などを考慮してW/O型エマルションを選び、さらにこれを改良して安定性を高めたS/O型エマルションを開発した。また薬物のリンパ移行を調べた従来の報告に用いられた実験方法がいずれもリンパ移行を詳細に解析するには不十分なので、リンパ系の解剖学および生理学的知見に基づいて生体を数個のコンパートメントに分け、各コンパートメント間の薬物移行を実験的に比較することにより薬物のリンパ移行を把握し剤形の評価を行なう実験系を考案し、大腿伸筋と胃漿膜下組織をモデル投与部位として選択した。以下、この新しいリンパ移行評価法を用いてエマルションの効果を検討した結果を論述する。

## I-2 ラット大腿伸筋に注射後の油脂および モデル薬物の移行

非経口薬物投与方法として静脈内、動脈内、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内、また関節腔内などの注入法があるが、製剤的に応用範囲が広く、かつ臨床的にも広く利用されているのは皮下および筋肉内投与方法である。この内、筋肉内投与は、注入位置として組織的に一定の部位が得られる点、取り出しが容易な点、および血管系などが明確になっている点などの利点を有することから、注射後の薬物吸収を検討する場合に広く用いられている。とりわけ、ラットの大腿伸筋を用いる方法は、Schou<sup>59)</sup>やKakemi,<sup>60)</sup>Kobayashi<sup>61)</sup>などの報告に用いられ、実験方法としても確立されている。そこで本研究でもこの部位を注射部位に選び基礎的検討を行った。<sup>62)</sup>

### 2-a 油脂の移行

本来水溶性で分子量が小さいため大部分が血行性に吸収される制癌剤をリンパ系に移行させるためには、剤形自身がリンパ指向性を持つことが必要である。こうした観点から、注射したエマルジョン油脂の移行を追跡することは、剤形の評価および選択に有用な知見を与えるものと考えられる。

油性注射剤は、脂溶性が高く水に溶けない薬物や、水溶性でも持続的作用を目的とする薬物の剤形として古くから繁用されている。しかし基剤として用いられる油脂の挙動については、DeaneslyとParkesの報告<sup>63)</sup>やBrownらの報告<sup>64)</sup>のように定性的に油脂の消失を扱ったものを除くとほとんど見当たらない。近年、Tanakaらは大腿伸筋に注射されたmethyl oleateの消失に関して報告を行い、<sup>65)</sup>またBollingerは Freund adjuvantとして動物を用いた免疫学的研究に繁用される流動パラフィンエマルジョンの注射後の体内挙動を追跡している。<sup>66)</sup>しかし注射剤として人体に用いられる植物油の注射後の動態を定量的に追跡した研究は少なく、特に各種製剤学的修飾を施した剤形における油脂の生体内動態を同一条件で比較した報告は見当たらない。以上の理由から、本研究では植物油の成分の一つである tripalmitin の<sup>14</sup>C標識化合物をトレーサーとして用い、植物油の動態を各剤形間で比較した。剤形はS/O型エマルジョン、W/O型エマルジョン、O/W型エマルジョンの三種類を用い、さらにゴマ油を単独で注射した場合も併せて比較した。実験にはWistar系雄性白色ラットを用い、右足の大腿四頭伸筋のうち大腿直筋の中央部に各剤形を注入した。一定時間後にラットを殺し、右大腿伸筋、所属リンパ節、および反対側のリンパ節を摘出し、同時に採血を行った。各臓器中の油脂の量を放射活性を指標として検討した。

Fig. 4は各剤形を注射後の大腿伸筋からの油脂の消失を示したもので、図から明らかなように各剤形とも注射後二相から成るパターンで消失し、注射後6時間以後に見られる消失の遅い相の消失速度定数は各剤形においてほぼ一定であった。初期の消失は、ゴマ油を注射した時に最も速く、O/W型エマルジョンの場合は最も遅かった。

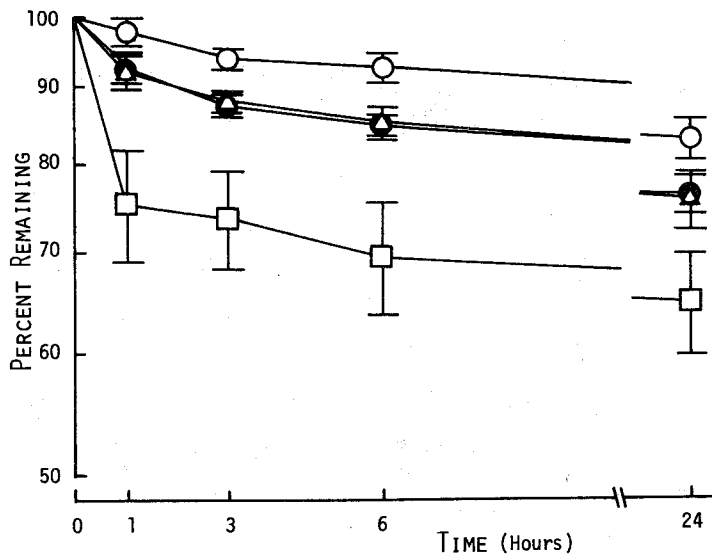


Fig. 4. Disappearance of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin from the thigh muscle after injection of various oil formulations. □, Oily solution; ○, O/W emulsion; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

これら4種類の剤形を注射した後の、所属リンパ節への油脂の移行を検討した結果を Fig. 5 に示した。また Fig. 6 には、注射部位の所属リンパ節の反対側に位置する左腸骨リンパ節中の油脂濃度を示した。Fig. 1 に示したモデルのように、所属リンパ節に移行した放射活性の中には、直接注射部位からリンパ行性に移行した部分以外に、一度循環血流へ移行した後リンパ節に分布した部分も含まれる。循環血流からの分布は左右のリンパ節に等しく行われると考えられるので、左リンパ節濃度を比較にとることにより直接リンパ行性に移行した量を推定することが可能となる。Fig. 5 で明らかなように、所属リンパ節への油脂の移行は S/O 型エマルションが最も大きく以下、W/O 型エマルション、O/W 型エマルション、ゴマ油の順となった。これに対し、対照リンパ節中濃度はいずれの剤形でも著しく低く、循環血流から所属リンパへ分布された油脂は少ないことが確かめられた。

Fig. 7 には各剤形における油脂の血中濃度の経時変化を示した。図より明らかなように、ゴマ油を製剤学的修飾を施さずにそのまま注射した場合に血中濃度が最も高く、第4図に示された注射部位よりの速い消失、および第5図に示された所属リンパ節中濃度が低い事実と併わせて、ゴマ油の注射では血行性に吸収されやすいことが示唆された。

次に、各剤形のリンパ移行性をより明確にするために、Fig. 5 および Fig. 6 に示した左右リンパ節中油脂濃度の比を計算し、その経時変化を Fig. 8 に示した。図より明らかなように各剤形ともその比は1.0 以上で、注射部位から所属リンパ節へ直接油脂が移行することが確かめられた。四種類の剤形の中では S/O 型エマルションが最も大きな比を示し、その値は注射6時間後に約120であった。

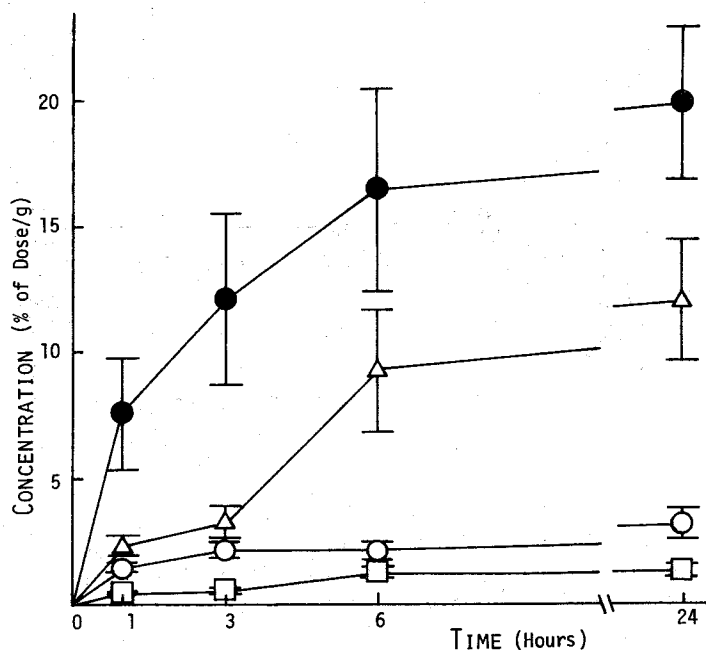


Fig. 5. Concentration of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin in the right iliac lymph node after intramuscular injection of various oil formulations. □, Oily solution; ○, O/W emulsion; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

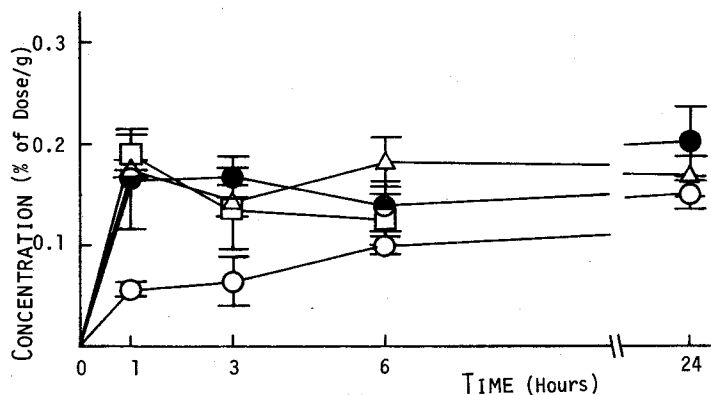


Fig. 6. Concentration of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin in the left iliac lymph node after intramuscular injection of various oil formulations. □, Oily solution; ○, O/W emulsion; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.



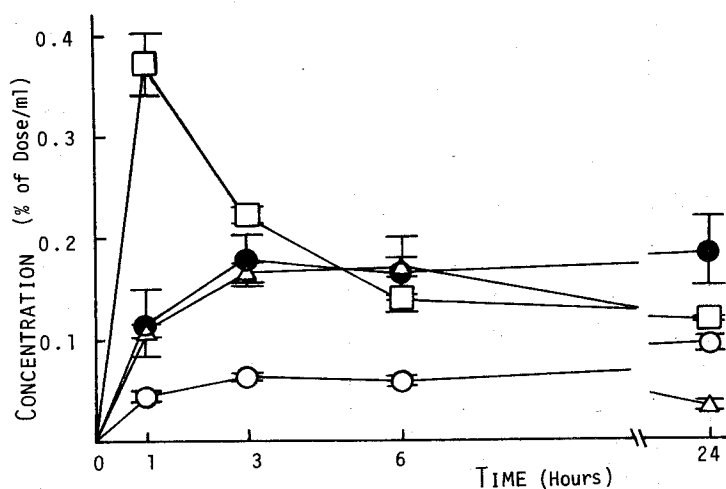


Fig. 7. Concentration of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin in the blood after intramuscular injection of various oil formulations. □, Oily solution; ○, O/W emulsion; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

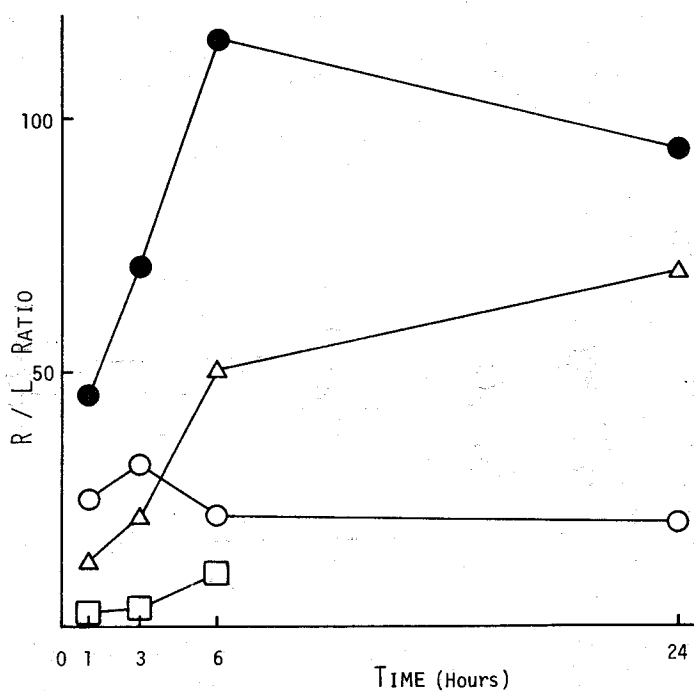


Fig. 8. The ratio of the concentration of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin in the right iliac lymph node to the left iliac lymph node (R/L ratio) after intramuscular injection of various oil formulations. □, Oily solution; ○, O/W emulsion; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion.

以上の結果、ゴマ油を基剤とする各剤形を注入した際、いずれの剤形においても油脂が所属リンパ節へ移行することが確かめられた。移行の程度はS/O型エマルジョンが最も大きく、W/O型エマルジョンがこれに続き、これらの剤形のリンパ指向性 drug delivery systemとしての有用性が示唆された。

## 2-b モデル薬物の移行

2-aにおいてゴマ油を基剤とする四種類の剤形を注射後の油脂のリンパ移行を比較した結果、S/O型が最も優れ、W/O型エマルジョンがこれに続くことが明らかとなった。また、これら二剤形では、水溶性の制癌剤を内部に封入することができるので、製剤技術上からも好都合と言える。以上の利点を考慮して、本研究ではこれら二剤形を delivery system として選び、その効果を生体内挙動の単純な hippuran<sup>67)</sup>をモデル薬物として検討した。

Fig. 9は、hippuranを内部の水相に封入して調製したS/O型エマルジョンとW/O型エマルジョンを大腿伸筋に注射した後の注射部位からの hippuran の消失を、水溶液の形で注射した場合と比較したものである。hippuranを水溶液として注射した際の消失は見掛け上一次式に従い、半減期は6分であった。この結果は筋肉注射された薬物の消失が一次式に従うという、Schouら<sup>59)</sup>やKakemiら<sup>60)</sup>の報告とよく一致した。

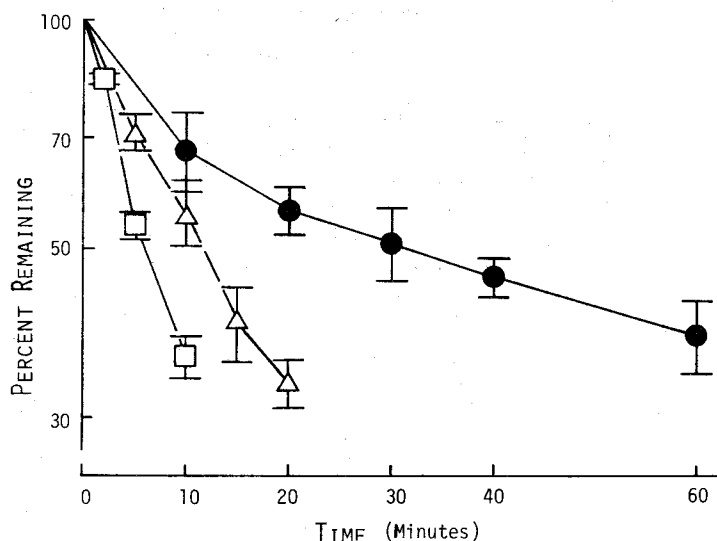


Fig. 9. Disappearance of hippuran from the thigh muscle after injection of various formulations. □, Aqueous solution; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean±SE of at least five animals.

一方、hippuranをエマルジョンの剤形で注射した際の消失は著しく遅延し、特にS/O型エマルジョンにおいて顕著であった。

Fig. 10は、hippuranを各剤形で注射した後の血中濃度の経時変化を、水溶液を静脈内注射した場合

と併せて比較したものである。静脈内注射の場合、血中濃度は投与5分後に高い値を示した後、速やかに低下した。これに対しエマルション、特にS/O型エマルションの場合は初期の血中濃度が低く、また以後の濃度低下も小さいことから、注射部位から循環血流への hippuran の移行が遅いことが示唆された。これは Fig. 9 に示された、注射部位からの消失の遅延化を反映したものと考察される。

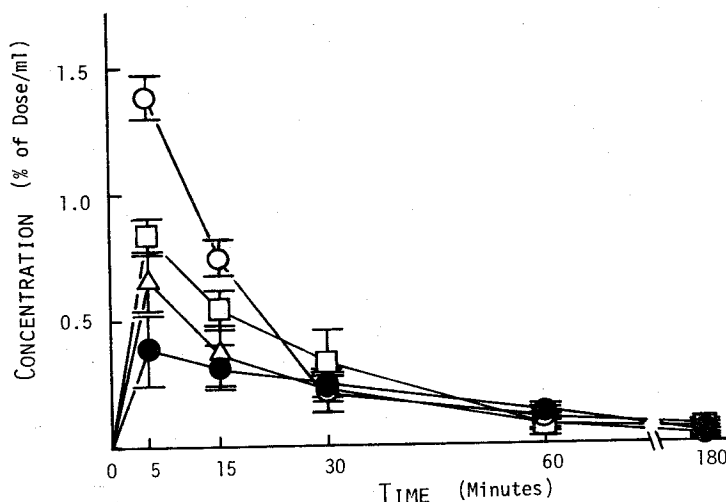


Fig. 10. Concentration of hippuran in the blood after intravenous injection or intramuscular injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intramuscular injection of aqueous solution; △, intramuscular injection of W/O emulsion; ●, intramuscular injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

次に、同一の実験における所属リンパ節中濃度の経時変化を比較したものが Fig. 11 である。また対照として、左腸骨リンパ節中 hippuran 濃度も測定し、結果を Fig. 12 に示した。注射部位の所属リンパ節中濃度は静脈内注射の場合より筋肉内注射の場合の方が高い値を示した。これに対し対照リンパ節では、投与経路による差は認められなかった。

これら剤形あるいは投与経路の影響をより明確にする目的で、油脂の場合と同様に右と左のリンパ節中濃度の比を計算し、その経時変化を示したのが Fig. 13 である。図より明らかなように、静脈内注射した場合は濃度比は常にほぼ 1 で、循環血流から左右のリンパ節へ等しい割合で薬物が分布することが示された。これに対し、筋肉内注射の場合にはいずれの剤形でも比は 1 以上となり注射部位から所属リンパ節へ hippuran が直接移行することが確かめられた。水溶液の形で注射した場合は、注射直後に大きい比を示したが、この値は注射 15 分後には低下し、hippuran が循環血流側に速やかに移行することが示唆された。一方、S/O 型エマルションでは注射後 3 時間にわたって hippuran が所属リンパ節に移行していることが示された。

以上の結果、エマルション特に S/O 型エマルションを剤形として筋肉内注射に用いることにより、薬物

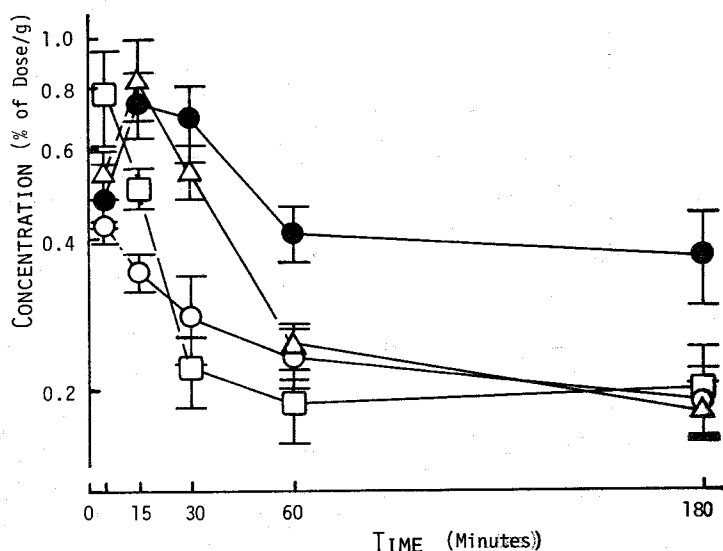


Fig. 11. Concentration of hippuran in the right iliac lymph node after intravenous injection or intramuscular injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intramuscular injection of aqueous solution; △, intramuscular injection of W/O emulsion; ●, intramuscular injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

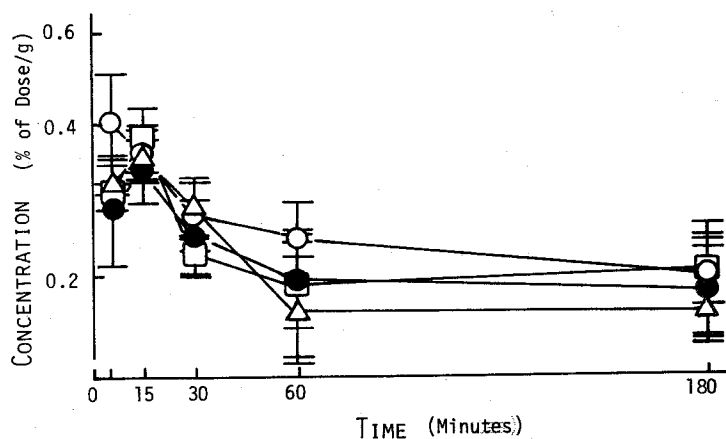


Fig. 12. Concentration of hippuran in the left iliac lymph node after intravenous injection or intramuscular injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intramuscular injection of aqueous solution; △, intramuscular injection of W/O emulsion; ●, intramuscular injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

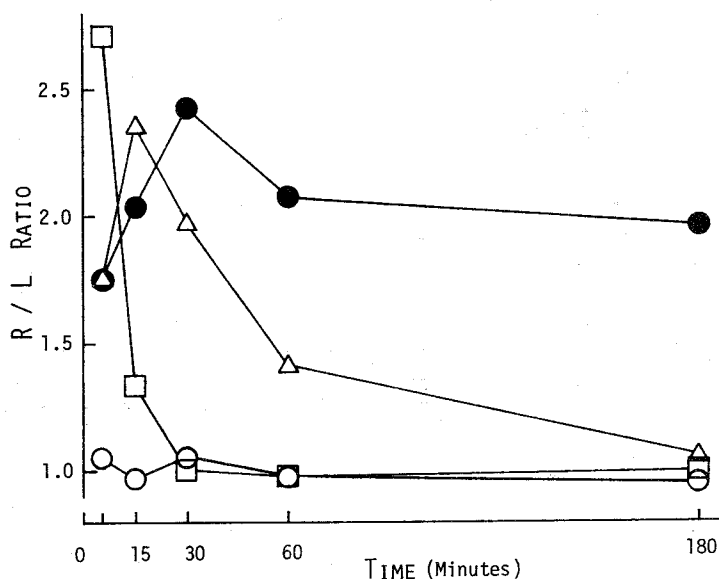


Fig. 13. The ratio of the concentration of hippuran in the right iliac lymph node to the left iliac lymph node (R/L ratio) after intravenous injection or intramuscular injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intramuscular injection of aqueous solution; △, intramuscular injection of W/O emulsion; ●, intramuscular injection of S/O emulsion.

の注射部位滞留性とリンパ移行性が改善されることが確かめられた。

## 2-c 組織学的検討

これまでの実験結果より、S/O型エマルションの剤形を注射した場合に油脂の移行が最も大きくまた hippuran のリンパ移行も著しく増大することが明らかとなり、S/O型エマルションの油滴が運搬体となって薬物をリンパ系に運んでいる可能性が示唆された。このようにエマルションが薬物のリンパ移行性を改善する機構を解明する目的で、エマルション注射後の大腿伸筋および所属リンパ節の凍結切片を作製し、組織学的検索を行った。組織は Fig. 11 の結果より、最も薬物のリンパ節濃度の高かった注射15分後に摘出して検索した。

Fig. 14はS/O型エマルション注射後の筋肉(a, b)および所属リンパ節(c, d)の顕微鏡写真である。(a)で明らかのように、注射後S/O型エマルションは直径約5~30 μmの油滴となって筋線維中に分散することが明らかとなった。(b)はこれを高倍率で観察した写真であるが、こうした油滴の中に直径1~3 μmの微粒子が分散しているのが認められ、S/O型エマルションが組織中で再分散し、複エマルションが形成されていることが明らかとなった。一方、所属リンパ節を検索すると(c)のように筋肉内より比較的小さい油滴が辺縁洞に分散し、一部は梁の部分にまで侵入していることが確かめられ、また(d)のように、これらの油滴の中にも微粒子が存在し、複エマルションの形態を保ったまま油滴が所属リンパ節に移行す

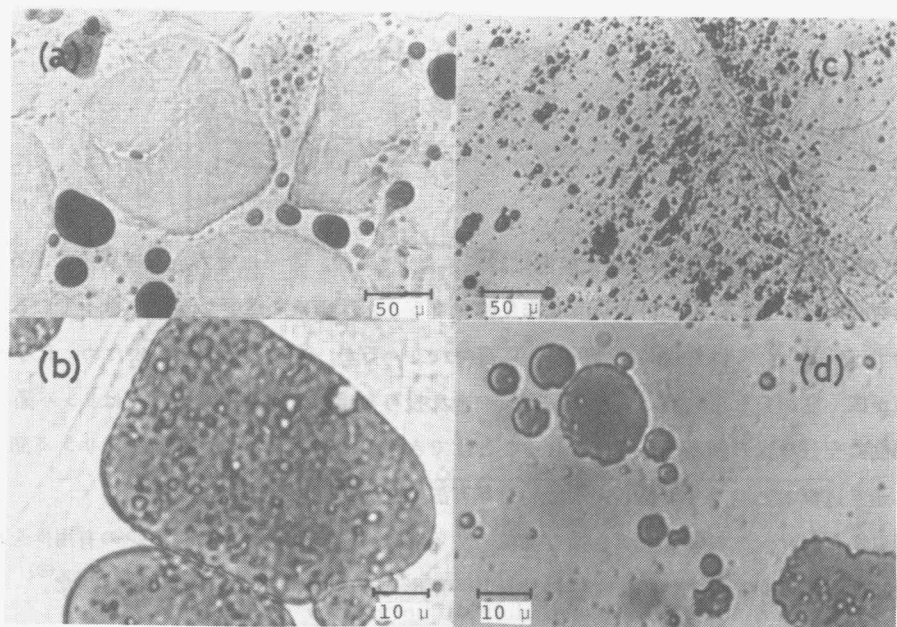


Fig. 14. Photomicrographs of the thigh muscle (a, b) and iliac lymph node (c, d) fifteen minutes after intramuscular injection of S/O emulsion, oil phase was colored by dissolving sudan blue prior to injection. Photo. a, c;  $\times 150$ . Photo. b, d;  $\times 600$ .

ることが証明された。薬物はこうした状態において最内部のゼラチン微粒子中に溶けて存在するので、以上の知見より複エマルションの油滴が運搬体として薬物をリンパ系に送り込む機構が明らかとなった。W/O型エマルションの場合も類似した結果が得られたが、複エマルションの安定性が悪いことが認められ、この事実がS/O型エマルションより効果が劣ることの理由の一つとなっていることが推察された。

## 2-d 考 察

局所注射の研究のモデル注射部位として、生物薬剤学研究にしばしば用いられるラットの大腿伸筋を用い、ゴマ油を基剤とする各種剤形のリンパ指向性を検討した。ゴマ油を単独で、あるいはS/O型、W/O型、およびO/W型エマルションの剤形で注射した結果、S/O型エマルションの場合に、剤形自身のリンパ移行性が最も大きく、W/O型エマルションがこれに続いた。モデル薬物の hippuran は同じくS/O型エマルションを剤形とした時に最もリンパ移行量が増大し、注射部位滞留性も顕著に改善された。組織学的検索により、注射されたS/O型エマルションは注射部位で再分散されて、最内相に薬物を包含した複エマルションとなり、この油滴が運搬体として薬物をリンパ系に運ぶことが明らかとなった。以上の実験事実を通じて、S/O型エマルションが、薬物にリンパ指向性を与える drug delivery systemとして、優れた剤形であることが示唆された。

### I-3 ラット胃壁に注射後の油脂および モデル薬物の移行

現在我国の癌による死亡数の60%以上は消化器癌によるもので、さらにその内%は胃癌によるものである。このため消化器癌特に胃癌に対する治療法を確立することは極めて重要な課題となっている。現在、胃癌を根治する手段としては外科的手術が第一に行われているが、術後の再発が多いため、化学療法との併用の必要性が広く認められている。<sup>68)</sup>しかし、従来の全身投与を手段とする化学療法ではリンパ節を代表とする転移部位に充分な量の制癌剤を到達させることはできず、消化器とりわけ胃の所属リンパ節に制癌剤を高濃度に送り込むことのできる新しい剤形、投与方法の開発が強く望まれている。

以上の理由から、ラットの胃をモデル投与部位とする実験系を考え、エマルジョンの有用性を検討すると共に、特に薬物のリンパ系内の移行動態に注目し、剤形の効果との関連を詳細に検討した。<sup>69)</sup>

#### 3-a 油脂の移行

大腿伸筋をモデル投与部位とした場合と同様に、ラットの胃に各剤形を注射した後基剤として用いた油脂の移行を追跡した。剤形としては、大腿伸筋において優れたリンパ移行性を示したS/O型エマルジョンとW/O型エマルジョンを用い、ゴマ油をそのままの形で注射した場合と併せて比較した。各剤形は、胃角部前壁側の漿膜下組織に注入し、一定時間ごとに各臓器内の油脂濃度を、 $^{14}\text{C}$ -tripalmitinの放射活性を指標に測定した。

Fig. 15は各剤形を胃壁に注入した後の注入部位からの油脂の消失を示したもので、図より明らかなように、いずれの剤形でも油脂は2相性に注射部位より消失し、三種類の剤形の中ではゴマ油を注射した場合に最も速い消失が認められた。これらの結果は大腿伸筋において得られた結果とよく一致し、両臓器共通の現象であることが示唆された。

Fig. 16は同じ実験において各時間ごとに摘出した所属リンパ節中の油脂の濃度の経時変化を示したものである。S/O型エマルジョンを注射した場合は、注射5分後に高い油脂濃度が得られ、その後徐々にこの値は低下した。またW/O型エマルジョンも値はS/O型より小さいが同様の傾向を示し、エマルジョンを注射した場合に、剤形自身が速やかに所属リンパ節へ移行することが示唆された。これは対して胃においても、ゴマ油単独を注射した場合にはリンパ系に移行しにくいことが明らかとなった。

次に、これらの実験において最もリンパ移行性に優れた剤形であることが証明されたS/O型エマルジョンを胃壁に注射し全身的な油脂の移行を精査した。Fig. 17には、S/O型エマルジョン注射後の血液および胸管リンパ中濃度を所属リンパ節中濃度とともに示した。血液はラットの頸動脈にカニューレを施して経時的に採血し、胸管リンパは胸管カニューレより採取した。図より明らかなように、血液にあるいは胸管リンパ中濃度は所属リンパ節中濃度より常に著しく低く、共に1/100以下の値を示した。両者

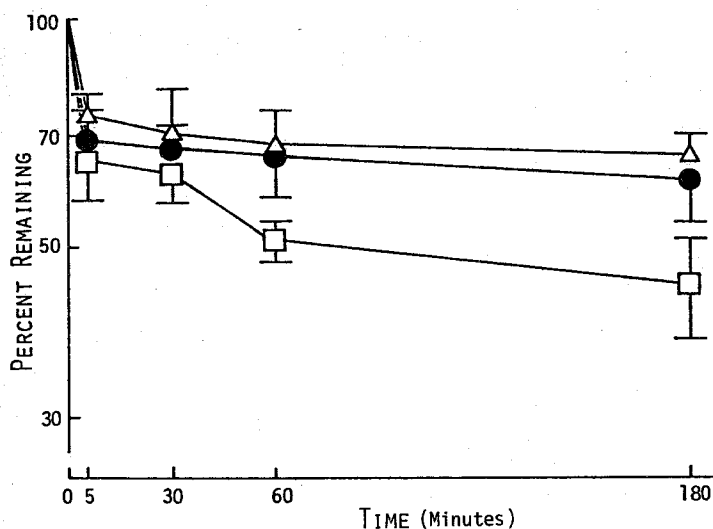


Fig. 15. Disappearance of <sup>14</sup>C-tripalmitin from the stomach wall after injection of various oil formulations. □, Oily solution; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean ± SE of at least five animals.

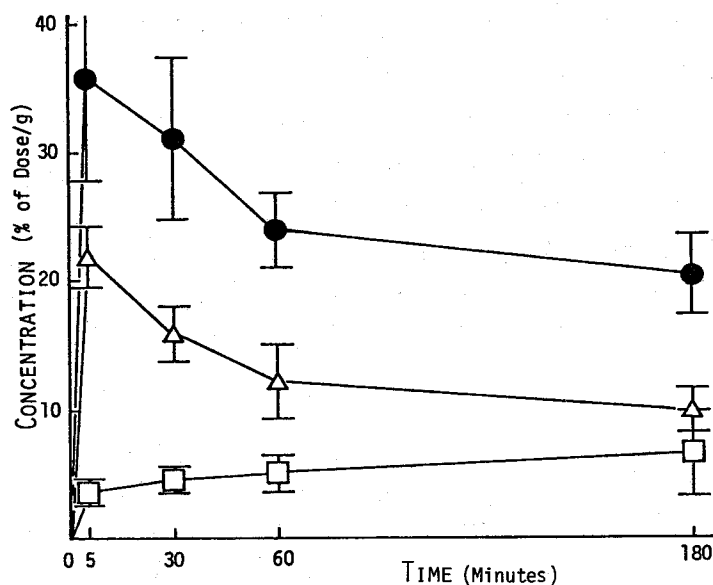


Fig. 16. Concentration of <sup>14</sup>C-tripalmitin in the regional lymph node after intragastric injection of various oil formulations. □, Oily solution; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean ± SE of at least five animals.



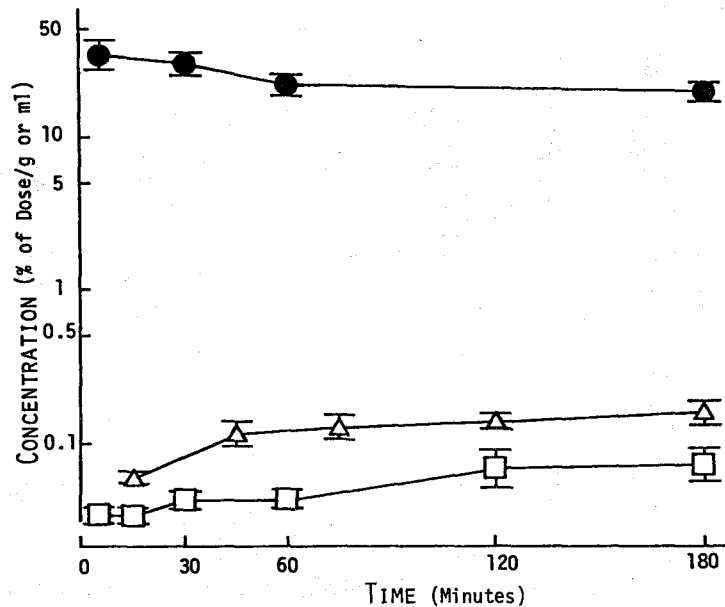


Fig. 17. Concentration of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin in various compartments after intragastric injection of S/O emulsion. □, Blood; ●, regional lymph node; △, thoracic lymph. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

の比較では、胸管リンパの方が血液より常に2～3倍高い値を示し、所属リンパ節から胸管へ油脂が徐々に移行することが明らかとなった。

以上の結果より、ゴマ油を基剤とする剤形を胃壁に注射した場合油脂が所属リンパ節へ高濃度に移行することが確かめられ、中でもS/O型エマルションが最も優れていることが証明された。また、S/O型エマルションを注射した後、油脂が注射部位→所属リンパ節→胸管リンパ→血液の順に移行することが解明され、さらに所属リンパ節中濃度が他と較べて著しく高いことから、注射部位および所属リンパ節に油脂が長く滞ることが示された。一方ゴマ油を単独で注射した場合には、油脂はリンパ系以外の経路で消失することが示唆された。

### 3-b モデル薬物の移行

ラットの胃壁に注射した場合の、モデル薬物 hippuran の体内挙動に及ぼすエマルションの効果を検討した。Fig. 18は hippuran を水溶液、S/O型エマルション、およびW/O型エマルションの各剤形で胃壁に注射した後の、注入部位からの消失を示したものである。水溶液の形で注射された hippuran は胃より速やかに消失し、一方、エマルションの形で投与した場合には消失の遅延化が認められた。これら各剤形の効果は大腿伸筋を投与部位とした場合と同様の傾向を示した。

次に、hippuran をこれら三種の剤形を用いて胃壁に注射した場合の血液中濃度の経時変化を、静脈内注射した場合と併せて比較した。Fig. 19に明らかなように、hippuran を静脈内注射した場合には血液中濃

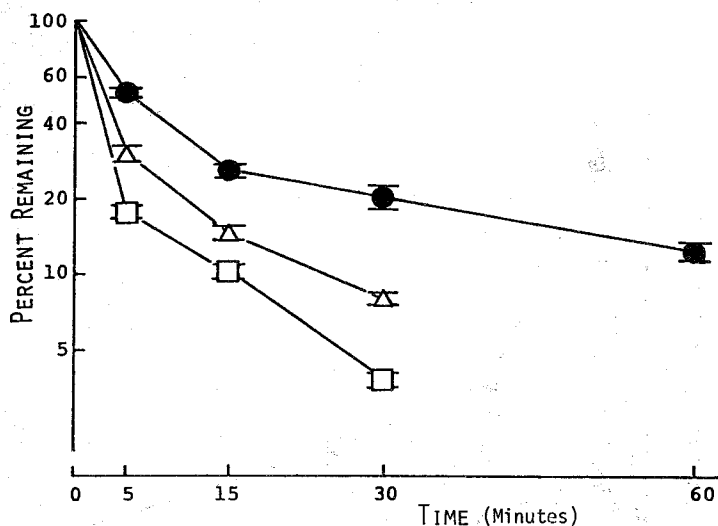


Fig. 18. Disappearance of hippuran from the stomach wall after injection of various formulations. □, Aqueous solution; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean±SE of at least five animals.

度は非常に速やかに低下した。また、水溶液の形で胃壁に注射した場合も、血液中濃度は注射直後に上昇した後、静脈内注射の場合と同様に速やかに低下した。これに対し S/O 型エマルションの場合は、最高血液中濃度が低く、その後の低下も緩徐で Fig. 18 に示された消失の抑制に対応する結果が得られた。

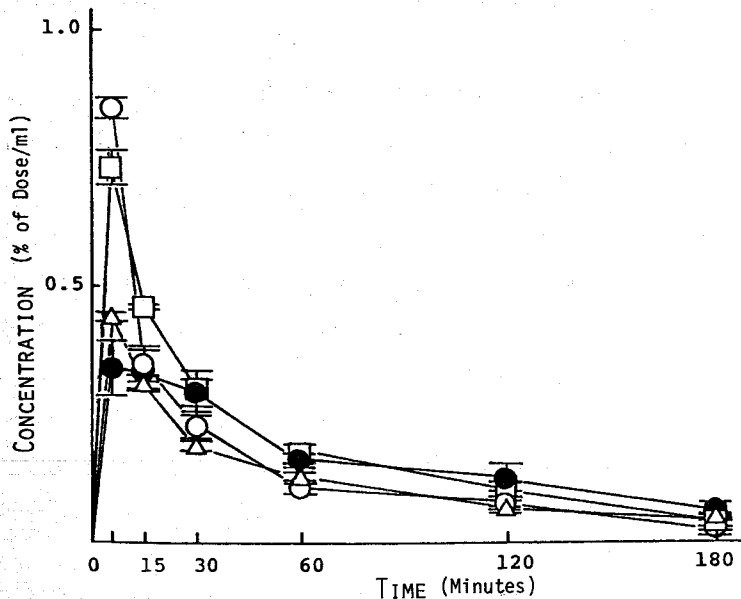


Fig. 19. Concentration of hippuran in the blood after intravenous injection or intragastric injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intragastric injection of aqueous solution; △, intragastric injection of W/O emulsion; ●, intragastric injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean±SE of at least five animals.

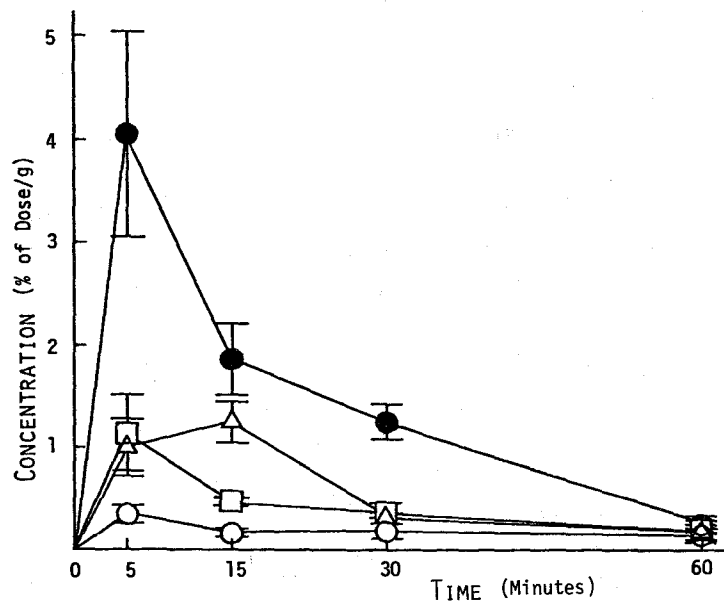


Fig. 20. Concentration of hippuran in the regional lymph node after intravenous injection or intragastric injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intragastric injection of aqueous solution; △, Intragastric injection of W/O emulsion; ●, intragastric injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean $\pm$ SE of at least five animals.

同じ実験における、hippuranの所属リンパ節中濃度の経時変化をFig. 20に示した。hippuranを静脈内注射した場合のリンパ節への分布は常に小さく、これに対し、水溶液の形で注射した場合は注射直後に有意に高いリンパ節中濃度が示され、hippuranが注射部位から所属リンパ節へ移行することが示唆された。しかしこの直接移行は注射後15分以内に終了することも明らかとなった。S/O型エマルションは最も高い濃度を示し、胃壁に注入した場合も薬物のリンパ移行を著しく改善することが確かめられた。

次に、剤形によるリンパ移行性改善効果を胸管段階で評価することを目的として、胸管リンパを経時的に採取し、hippuranの濃度を測定した。Fig. 21 (a)から明らかなように、胸管リンパ中濃度は、静脈内注射の場合が最も低く、S/O型エマルションの場合に最も高い値が得られ、所属リンパ節中濃度と同じ順序となった。しかしながら剤形間の効果の差は所属リンパ節の場合より小さく、他の臓器から流入したリンパによる希釈の影響が示唆された。(b)には、実験中のリンパ流量を示したが、各採取時間および剤形間で有意の差は認められなかった。

以上の知見より、ラットの胃壁を注射部位とした場合にも、S/O型エマルションが薬物のリンパ移行を増大させ注射部位滞留性を高めることが明らかとなった。

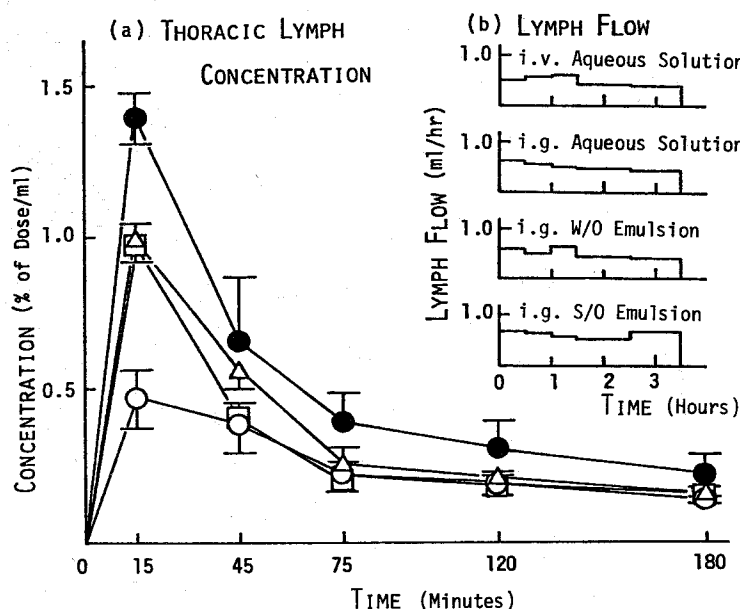


Fig. 21. Concentration of hippuran in the thoracic lymph (a) and average lymph flow (b) after intravenous injection or intragastric injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intragastric injection of aqueous solution; △, intragastric injection of W/O emulsion; ●, intragastric injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

### 3-c 薬物のリンパ節における動態

リンパ節はリンパ組織から成る小器官で、連続するリンパ管の途中に存在する。<sup>70)</sup> Virchow<sup>71)</sup>以来、リンパ節は堰止めの役目をはたすと考えられ、Chinese ink<sup>30)</sup>、ceramic 粒子<sup>72), 73)</sup>、金コロイド<sup>32)</sup>、細菌<sup>74)</sup>、赤血球<sup>75)</sup>などを捕捉することが報告されている。癌組織から遊離し、リンパ管内に侵入した癌細胞も同様にリンパ節で捕捉され、<sup>76), 77)</sup>そこで生体防御反応に打ち勝った細胞が増殖しリンパ節移転を形成する。このように、リンパ節は癌の転移に重要な役割を果たし、化学療法を実施する際には標的臓器となるので、リンパ節における薬物の動態を究明することは臨床的にも重要と思われる。一方、本研究において制癌剤の運搬体となるエマルションの油滴もリンパ節において捕捉されることが既に証明されているので、所属リンパ節における油脂および薬物の動態を比較することにより、エマルションが薬物をリンパ系に送り込む機構の詳細がより明らかとなることが予想される。

薬物を注射した後のリンパ系を中心とした全身移行動態は、Fig. 1に示したモデルにより解析可能であることを既に明らかにしたが、この内所属リンパ節に関連したコンパートメントを取りあげ、Fig. 22に整理した。所属リンパ節を中心に薬物のリンパ移行を考えると、薬物は注射部位から流入し、所属リンパ節内を通過して胸管の方向に流出する。この際、他の部位を介して常に薬物が循環血流からも各コンパー

トメントに供給されていることを考慮しなくてはならない。また、胃を注射部位とした場合には、各臓器間の解剖学的距離が近いことから、コンパートメント間の移行に時間のずれは無いものと仮定した。

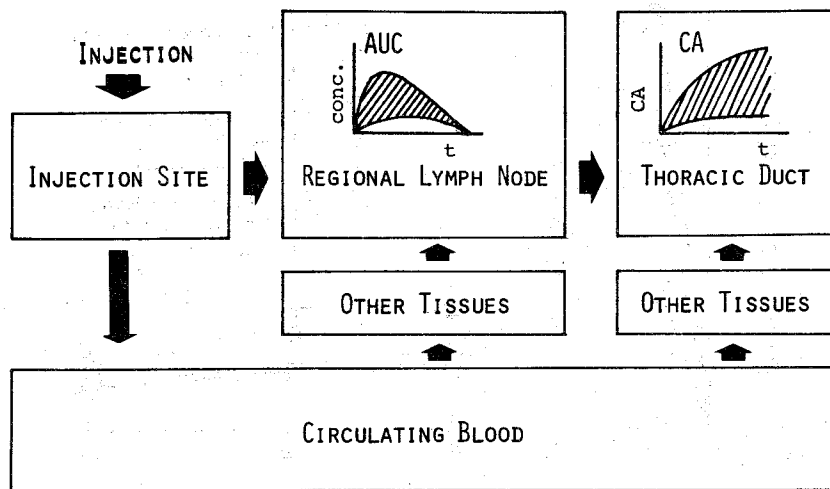


Fig. 22. Schematic diagram of a model of drug transfer through the regional lymph node following topical injection.

このモデルにおいて、循環血流から所属リンパ節と胸管に移行した薬物の量を無視し得ると考え、薬物が注射部位→所属リンパ節→胸管の方向にのみ移行したものと仮定すると、ある時間  $a$  内に所属リンパ節を通過した全薬物量 ( $X_{LN}$ ) は同時間における胸管リンパ中への薬物の総回収量 ( $CA$ ) に等しいと考えられる。

$$X_{LN} = CA \quad (\text{Eq. 1})$$

一方、時間  $a$  の間に所属リンパ節に流入した薬物が、所属リンパ節内を平均  $x$  時間かかって通過し胸管リンパへ全量流出したと想定し、その際のリンパ節重量を  $W_{LN}$ 、時間  $t$  におけるリンパ節中薬物濃度を  $C$  とすると、

$$X_{LN} = \frac{\int_0^a C dt \times W_{LN}}{x} \quad (\text{Eq. 2})$$

の関係が成立する。これを変形すると、

$$x = \frac{\int_0^a C dt \times W_{LN}}{X_{LN}} \quad (\text{Eq. 3})$$

となり、各剤形を注射した際の薬物の所属リンパ節平均通過時間 ( $x$ ) は、 $X_{LN}$ 、 $\int_0^a C dt$ 、 $W_{LN}$  の3つの値が求められれば計算できることになる。ここで、 $\int_0^a C dt$  は時間  $a$  内におけるリンパ節中の薬物の area under the concentration-time curve (AUC) に他ならないので、Fig. 20より幾何学計算を用いて求めることができ、また  $W_{LN}$  は実測値を使うことができる。さらに、Eq. 1より  $X_{LN}$  を  $CA$  に置きかえることができ、 $CA$  は Fig. 21に示した結果より計算できる。従って  $x$  は実験値を用いて理論的に求めることが

できることになる。

実際には、始めの仮定とは異なり、所属リンパ節と胸管リンパにはこの経路以外に循環血流からも薬物が供給されるので、所属リンパ節における AUC および胸管リンパへの CA を補正する必要がある。本研究では、Fig. 20 および Fig. 21 に示したいずれの実験においても静脈内注射した場合の所属リンパ節中濃度と胸管リンパ中濃度を測定したので、他の剤形を用いて胃壁に注射した場合に、一度循環血流に吸収された後再分布した薬物量が静脈内注射後の分布薬物量に等しいと仮定すると、実際直接リンパ系に移行した薬物による AUC と CA は、各剤形の AUC、CA と静脈内注射した時の AUC、CA の差として求めることができる。こうして求めた各剤形の AUC を Table 2、CA を Table 3 に整理した。リンパ節の通過は事実上

Table 2. The Area under Concentration-time Curves (AUC) of Hippuran in the Regional Lymph Nodes during the First Hour after Intravenous Injection or Intragastric Injection of Various Formulations.

Injection Form	AUC (% of dose/g×min)	
	Total AUC	Calculated AUCig-AUCiv
I. V. Aqueous Solution	11.31	0
I. G. Aqueous Solution	24.66	13.35
W/O Emulsion	33.52	22.21
S/O Emulsion	85.28	73.97

These values were calculated from the data shown in Fig. 20.

Table 3. Cumulative Amount (CA) of Hippuran Transferred into Thoracic Duct during the First Hour or Three-and-a-half Hours after Intravenous Injection or Intragastric Injection of Various Formulations.

Injection Form	CA (% of dose)			
	1 hour		3.5 hours	
	Total CA	Calculated CAig-CAiv	Total CA	Calculated CAig-CAiv
I. V. Aqueous Solution	0.228	0	0.432	0
I. G. Aqueous Solution	0.403	0.174	0.612	0.180
W/O Emulsion	0.413	0.185	0.662	0.230
S/O Emulsion	0.712	0.484	1.121	0.690

These values were calculated from the data shown in Fig. 21.

一時間以内に終了していることから、解析は 1 時間値を用いて行なった。こうして計算した、平均通過時間を平均リンパ節重量と共に整理したのが Table 4 である。

Table 4. Average Weight of Lymph Nodes and Calculated Mean Transit Time of Hippuran for Each Formulations.

Formulation	Average Weight of Lymph Nodes(g)	Mean Transit Time (min)
Aqueous Solution	0.025	1.89
W/O Emulsion	0.023	2.80
S/O Emulsion	0.026	4.05

こうした解析の結果、S/O型エマルションでは水溶液で注射した場合の2倍以上の時間薬物がリンパ節に滞ることが明らかとなり、リンパ節において hippuran がエマルションの油滴中から徐々に放出されることが示唆された。

### 3-d 考 察

臨床における応用を考慮して、ラットの胃をモデルに用いてエマルションの有用性を検討した。油脂を基剤とする各剤形を胃壁に注射した結果、S/O型エマルションが最もリンパ移行性に優れることが明らかとなった。また、モデル薬物 hippuran のリンパ移行も S/O型エマルションによって著しく改善され、この剤形が臨床応用を目的とした drug delivery system として有望であることが示唆された。

リンパ節内におけるリンパ流の速度あるいは通過時間などに関する基礎生理学的報告は一部<sup>49), 78)</sup>を除いてなく、薬物の移行と注入操作や剤形の関連を調べた報告も全く見当たらない。本研究では、所属リンパ節、胸管リンパへの油脂の移行を追跡し、エマルションの油滴が所属リンパ節に捕捉され、その後徐々に胸管リンパに移行することが明らかとなった。一方、hippuran のリンパ節における動態を薬物速度論的に解析した結果、hippuran の所属リンパ節平均通過時間は S/O型エマルションの場合に最も長く、油脂の結果と併せて、リンパ節に捕捉された油滴中から徐々に hippuran が放出されることが示唆された。またこれらの知見は大腿伸筋に注射後のリンパ節の組織学的検索の結果とも良い対応を示した。

以上の知見より、エマルションが薬物のリンパ移行性を増大させるための条件として、(1)複エマルションの油滴が高濃度にリンパ節に到達する、(2)油滴に薬物が安定に保持されている、という二点を満たす必要があることが明らかとなったが、S/O型エマルションはこの二点を共に満たすことにより効果を発揮するものと推察される。

エマルションの効果を、大腿伸筋に注射した場合と、胃壁に注射した場合とで比較すると、胃壁に注射した場合の方が剤形の効果が著明であったが、これは両臓器のリンパ系の密度の差が反映されたものと考えられる。筋肉では筋鞘にはリンパ管が分布しているが、個々の筋線維間には毛細リンパ管は無いと言われている<sup>10)</sup>。従って、油滴がリンパ系に移行するためには筋鞘にまで到達する必要があると思われる。一方、胃はリンパ管の豊富な臓器とされ、漿膜下にもリンパ管網が発達している<sup>31), 79)</sup>。この結果、胃では油滴の毛細リンパ管への侵入がより容易に行なわれ、エマルションの効果もより顕著に現われるものと推察される。このような性質は消化器全般に見いだされ、Sheppard<sup>80)</sup>らの報告によれば、小腸壁からの albumin のリン

パ移行は胃からの数倍の速さを示し、大腸でもほぼ同程度だとされている。以上の事実より、S/O型エマルションは、特に癌発生の頻度の高い消化器に用いた場合に、リンパ指向性 delivery systemとして非常に有用であることが示唆された。



## I-4 油中微粒子型エマルジョンによる 5-fluorouracil のリンパ移行性改善

5-FU は purine と共に核酸合成の前駆物質として重要な pyrimidine の代謝における拮抗物質で, Duschinsky<sup>81)</sup> によって合成され, Heidelberger<sup>82)</sup> により実験的に抗癌作用を有することが確認された。5-FU は幅広い抗癌スペクトラムを示すことから, 今日臨床的に最も広く用いられ, 特に他の制癌剤では効果の低い消化器系の癌, ことに腺癌に著効を示し, 大きな評価を受けている。しかしながら, この薬物は生体内で速やかに代謝分解を受け, 癌組織に十分な薬剤濃度を到達させるのが困難な反面, 使用中に白血球減少などの副作用が発現することから投与が制限され, より効果を増強する投与方法, 剤形の開発が望まれている。以上の理由より, 5-FU の S/O 型エマルジョンを調製し, その有用性をラットを用いて比較検討した。<sup>83)</sup>

### 4-a 大腿伸筋に注射後の移行

5-FU は pka 8.1 の弱酸性薬物で,<sup>84)</sup> 水にはよく溶けるが有機溶媒には溶けにくく, chloroform : 水間の分配係数は 0.11<sup>85)</sup> と報告されている。従って, S/O 型エマルジョンの剤形に調製した場合は大部分が内部のゲル中に溶けて存在すると考えられる。本研究では第 1 表に示した処方を用いてエマルジョンを調製し, その際エマルジョン 40  $\mu$ l 中に 5-FU 100  $\mu$ g を含むようにした。また, 定量は, <sup>3</sup>H ラベルにした 5-FU の放射活性を指標とする方法と, Staphylococcus aureus 209P に対する抗菌活性を指標とする方法を用い, 前者は臓器内濃度, 後者は体液中濃度の測定に主として用いた。

Fig. 23 は, ラットの大腿伸筋に, 5-FU を各剤形で注射した後の注射部位からの消失を示したものである。水溶液の形で投与した 5-FU は見掛け上一次式に従って速やかに消失し, 半減期は約 3 分であった。これに対しエマルジョンの剤形で注射した場合は, 消失が著しく遅延することが明らかとなった。

次に, これら各剤形で 5-FU を筋肉内注射した後の血漿中濃度を bioassay で測定し, 静脈内注射した場合と併せて比較した。Fig. 24 から明らかなように, 静脈内注射の場合の血液中からの消失は非常に速く, Garret らの報告<sup>86)</sup> によるヒトの場合と同様の結果が得られた。大腿伸筋に注射した場合には, 血漿中濃度の経時変化と Fig. 23 に示された注射部位からの消失との間に良い対応のあることが確かめられた。

Fig. 25 には, 所属リンパ節中の<sup>3</sup>H ラベルした 5-FU 濃度の経時変化を示し, Fig. 26 には比較として, 反対側のリンパ節中濃度を示した。リンパ節中濃度は S/O 型エマルジョン投与の場合に最も高く, W/O 型エマルジョンがこれに続いた。これに対し, 静脈内注射した場合は常に最も低いリンパ節中濃度を示した。対照リンパ節中の 5-FU 濃度には, 投与経路, 剤形間で有意な差は認められなかった。

以上の知見より, 5-FU を大腿伸筋に注射した場合にも, エマルジョンの効果が hippuran の場合と同様に発揮されることが明らかとなった。

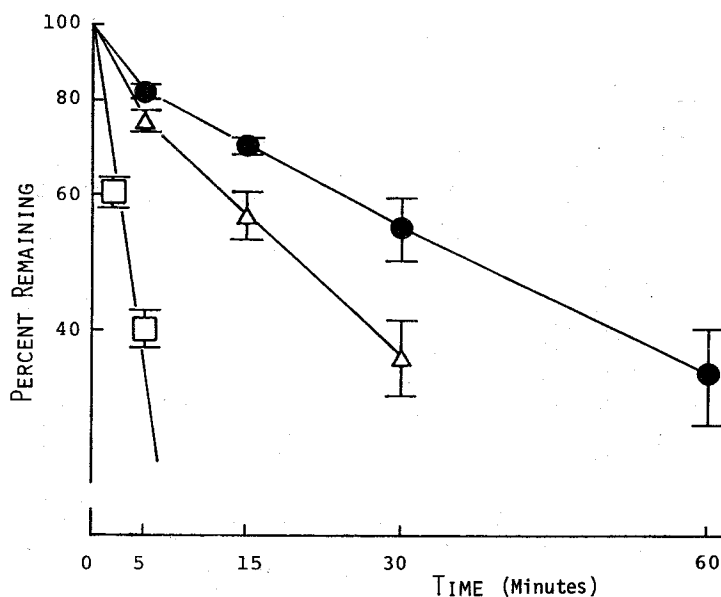


Fig. 23. Disappearance of radioactive 5-FU from the thigh muscle after injection of various formulations. □, Aqueous solution; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

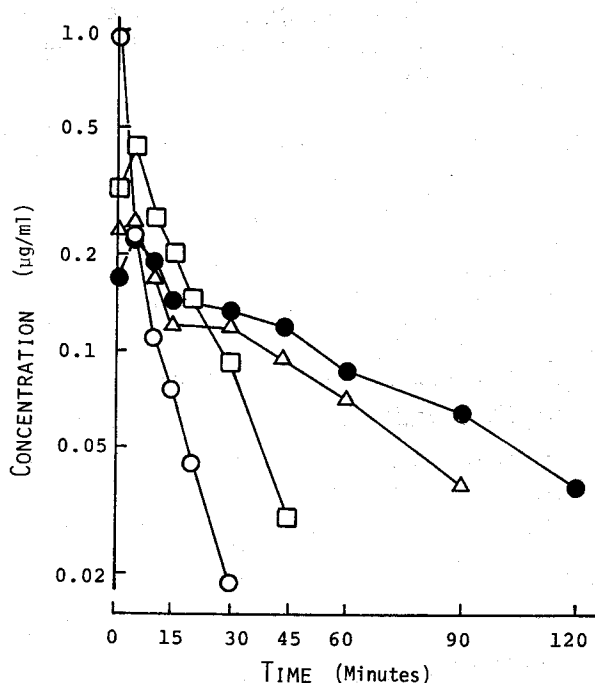


Fig. 24. Plasma concentration of 5-FU after intravenous injection or intramuscular injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intramuscular injection of aqueous solution; △, intramuscular injection of W/O emulsion; ●, intramuscular injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean values of at least five animals.

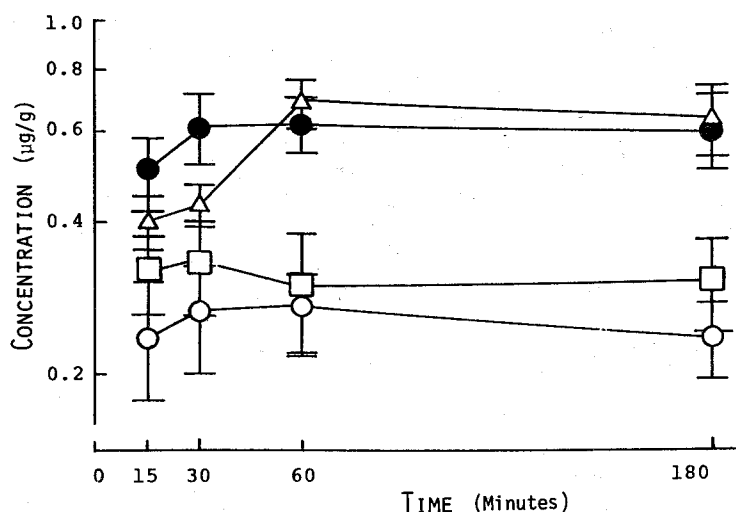


Fig. 25. Concentration of radioactive 5-FU in the right iliac lymph node after intravenous injection or intramuscular injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intramuscular injection of aqueous solution; △, intramuscular injection of W/O emulsion; ●, intramuscular injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

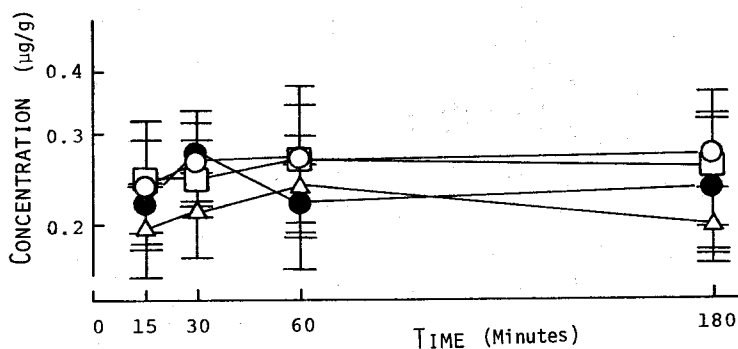


Fig. 26. Concentration of radioactive 5-FU in the left iliac lymph node after intravenous injection or intramuscular injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intramuscular injection of aqueous solution; △, intramuscular injection of W/O emulsion; ●, intramuscular injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

#### 4-b 胃壁に注射後の移行

既に明らかにしたように、エマルジョンによる hippuran のリンパ移行増大効果は、大腿伸筋に注射した場合より胃壁に注射した場合の方が顕著であった。そこで 5-FU においても胃を注射部位とする実験を行い、臓器による差の一般性を調べると共に、併せて 5-FU S/O 型エマルジョンの臨床応用の可能性を検討した。

Fig. 27 は 5-FU の各剤形を胃壁に注射した後の注射部位からの消失を示したものである。消失は水溶

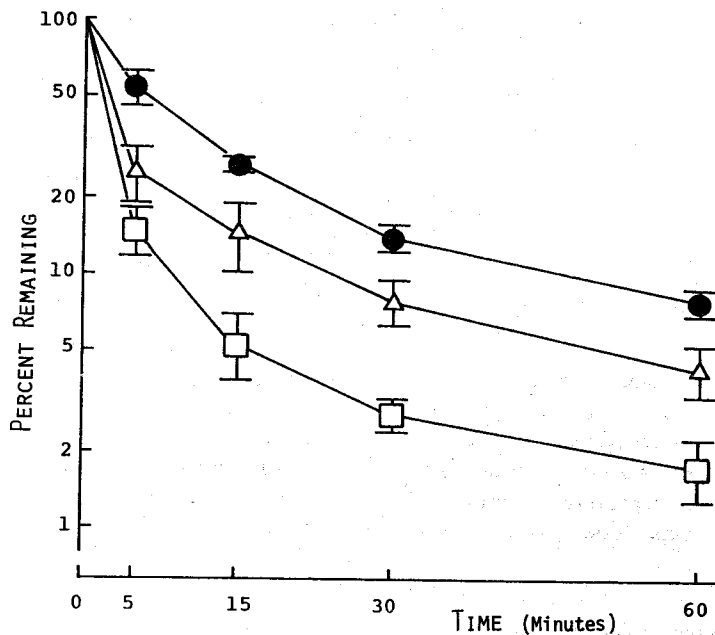


Fig. 27. Disappearance of radioactive 5-FU from the stomach wall after intragastric injection of various formulations. □, Aqueous solution; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

液が速く、S/O 型エマルジョンが最も遅く大腿伸筋の場合と同様の傾向が認められたが、全体に消失速度は胃壁の方が大きいという結果となった。

次に、各剤形で 5-FU を胃壁に注射した後の血漿中濃度を測定し、静脈内注射の場合と併せて Fig. 28 に示した。大腿伸筋の場合と異なり、5-FU を胃壁に注射した場合は剤形によらず、血漿中の抗菌活性は著しく低く、同量を静脈内注射した場合を常に下回った。この現象は hippuran の場合には認められず、従って 5-FU の代謝分解の寄与が推論された。5-FU は生体内において速やかに代謝分解を受けるが、その主代謝臓器は肝臓であることが知られている。<sup>81)</sup> 一方、胃を通過した静脈血は、小腸、大腸から集まった血液と共に門脈を経て肝臓を通過することが知られ、これらの事実より胃壁に注射された 5-FU は肝臓における初回通過効果を受け全身循環血流に入る前に分解されたものと推論される。

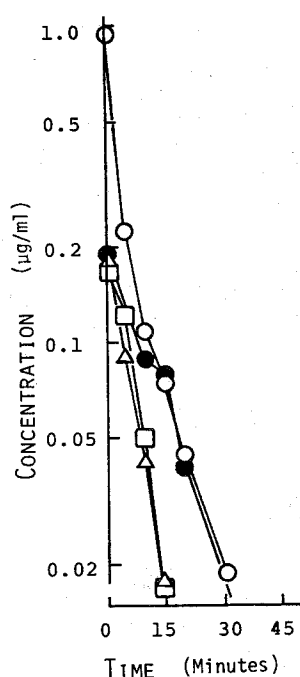


Fig. 28. Plasma concentration of 5-FU after intravenous injection or intragastric injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intragastric injection of aqueous solution; △, intragastric injection of W/O emulsion; ●, intragastric injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean values of at least five animals.

Fig. 29 は 5-FU の所属リンパ節中濃度の経時変化を示したものである。静脈内注射の場合は常に最も低い濃度を示した。これに対し胃壁に注射した場合は、いずれの剤形でも静脈内注射の場合より有意に高い濃度を示し 5-FU が注射部位から直接所属リンパ節に移行していることが証明された。三種類の剤形の中では S/O 型エマルションが高い濃度を示し、W/O 型エマルションがこれに続いた。これに対し、水溶液の場合は注射直後においてのみ 5-FU が移行することが明らかとなった。

次に、5-FU を胃壁に注射した後の胸管リンパ濃度を、抗菌活性を指標として測定した。Fig. 30 (a) には胸管リンパ中濃度の経時変化を、(b) には実験期間中の平均リンパ流量を示した。Fig. 29 に示した所属リンパ節中濃度と同様に、胸管リンパ中濃度も S/O 型エマルションが最も高く、以下 W/O 型エマルション、水溶液、静脈内注射の順となった。特に S/O 型エマルションは注射後 60 分まで胸管リンパ中に検出され、30 分以内に検出不能となった他の剤形と比較して、リンパ移行が増大しかつ持続化されていることが明確になった。

以上の結果より、既に論述した hippuran の場合と同様に 5-FU についても所属リンパ節における AUC と胸管リンパ中総回収量 (CA) の計算が可能となったので同様の解析を行った。

Table 5 には、計算した各剤形ごとの AUC および、この値から静脈内注射時の AUC を減じて直接リンパ

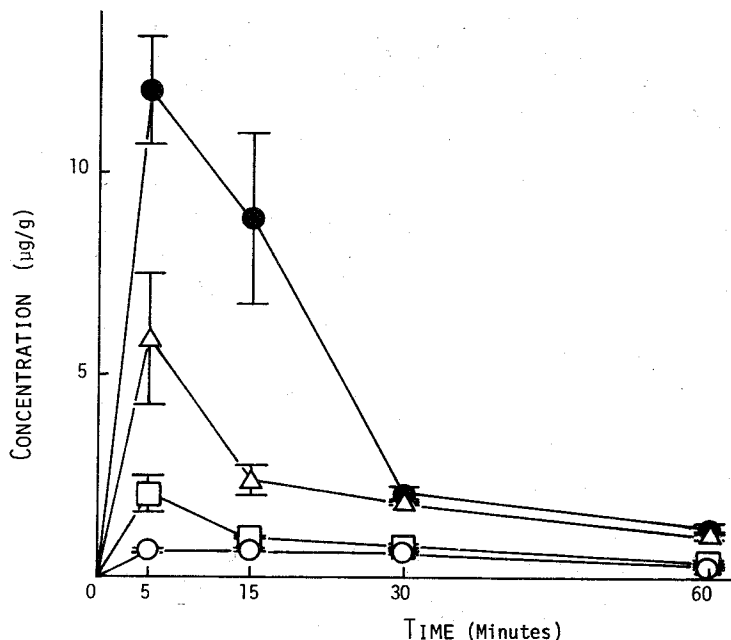


Fig. 29. Concentration of radioactive 5-FU in the regional lymph node after intravenous injection or intragastric injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intragastric injection of aqueous solution; △, intragastric injection of W/O emulsion; ●, intragastric injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

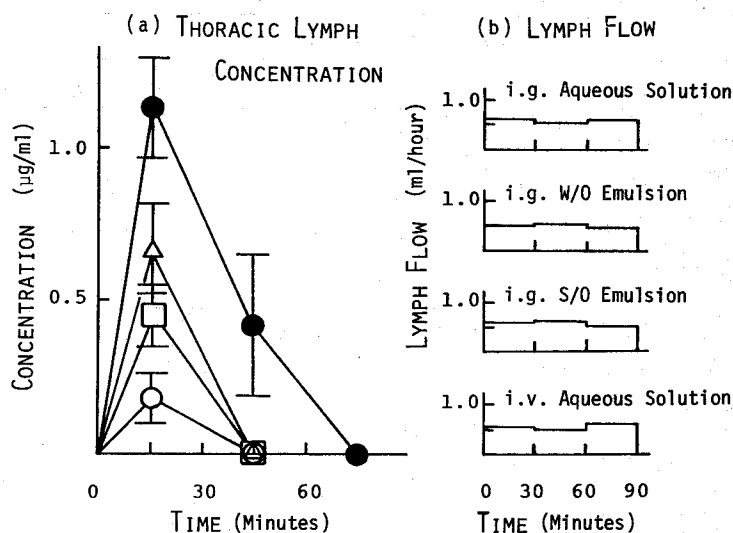


Fig. 30. Concentration of 5-FU in the thoracic lymph (a) and average lymph flow (b) after intravenous injection or intragastric injection of various formulations. ○, Intravenous injection; □, intragastric injection of aqueous solution; △, intragastric injection of W/O emulsion; ●, intragastric injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

Table 5. The Area under Concentration-time Curves (AUC) of Radioactive 5-FU in the Regional Lymph Nodes during the First Hour after Intravenous Injection or Intragastric Injection of Various Formulations.

Injection Form	AUC ( $\mu\text{g/g} \times \text{min}$ )	
	Total AUC	Calculated AUC <sub>ig</sub> - AUC <sub>iv</sub>
I.V. Aqueous Solution	32.13	0
I.G. Aqueous Solution	50.24	18.11
W/O Emulsion	131.73	99.60
S/O Emulsion	266.91	234.78

These values were calculated from the data shown in Fig. 29.

系に移行した5-FUによるAUCを求めた結果を整理した。注射後1時間における、S/O型エマルションのAUCは静脈内注射の場合の約8倍、また直接移行分によるAUCは水溶液の場合の13倍となり、この剤形が5-FUの所属リンパ節におけるbioavailabilityを著しく改善することが示された。

Table 6には、同様に各剤形ごとの胸管リンパへの総移行量を整理した。静脈内注射の値を減じて求め

Table 6. Cumulative Amount (CA) of Antimicrobially Active 5-FU Transferred into Thoracic Duct during the First Hour after Intravenous Injection or Intragastric Injection of Various Formulations.

Injection Form	CA ( $\mu\text{g}$ )	
	Total CA	Calculated CA <sub>ig</sub> - CA <sub>iv</sub>
I.V. Aqueous Solution	0.053	0
I.G. Aqueous Solution	0.141	0.088
W/O Emulsion	0.218	0.165
S/O Emulsion	0.430	0.377

These values were calculated from the data shown in Fig. 30.

た直接移行量は、S/O型エマルションが、水溶液の5倍の値となった。

次に3-cのEq.3を用い、Table 5, Table 6の結果およびTable 7に示した各実験ごとの平均リンパ節重量を代入して、各剤形ごとの5-FUの所属リンパ節における平均通過時間を計算し同じくTable 7に整理した。平均通過時間はS/O型エマルションが水溶液の4倍以上長く、hippuranの場合と同様、エマルションによって5-FUがリンパ節に長くどまっていることが示された。

Table 7. Average Weight of Lymph Nodes and Calculated Mean Transit Time of 5-FU for Each Formulations.

Formulation	Average Weight of Lymph Nodes (g)	Mean Transit Time (min)
Aqueous Solution	0.023	3.93
W/O Emulsion	0.022	9.32
S/O Emulsion	0.026	16.19

#### 4-c 代謝に対する影響

5-FUは uracil の5位の水素が弗素と置換された構造を有し、分解も uracil の異化反応と同じ過程をたどって、主に肝臓において dihydro-5-fluorouracil になり、続いて 2-fluoro- $\beta$ -alanine と尿素、二酸化炭素、およびアンモニアに分解される。<sup>87)</sup>

本実験では5-FUの組織内濃度の定量を抗菌活性あるいは放射活性を指標に行った。Clarkson<sup>88)</sup>は5-FUの代謝産物は抗菌活性を持たないことを報告しているので、抗菌活性は未分解の5-FU濃度を示すと考えられる。一方、本実験で用いた5-FUの<sup>3</sup>H標識化合物は6位の炭素に結合しているので、代謝によって<sup>3</sup>H標識を含む部分は2-fluoro- $\beta$ -alanineに変換され、結局放射活性は5-FUに由来する分子の動態を代謝の如何にかかわらず示すものと予想される。著者は以上の観点から両測定法によって得た結果を比較し、代謝をも含めた5-FUの動態とそれに及ぼす投与方法、剤形の効果を考察した。

Table 8には、5-FUを各剤形で胃壁に注射し5分後の血漿中濃度と所属リンパ節中濃度、および注射

Table 8. Comparison of Radioactive and Antimicrobially Active Concentration of 5-FU in Plasma, Regional Lymph Nodes, and Thoracic Lymph after Intravenous Injection or Intragastric Injection of Various Formulations.

Injection Form	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ or g)					
	Plasma		Regional Lymph Nodes		Thoracic Lymph	
	Method A <sup>a</sup>	Method B <sup>b</sup>	Method A	Method B	Method A	Method B
I.V. Aqueous Solution	0.74 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.23 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>	0.98 $\pm$ 0.18 <sup>d</sup>	0.18 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
I.G. Aqueous Solution	0.56 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.03	2.1 $\pm$ 0.5	2.8	1.31 $\pm$ 0.20	0.45 $\pm$ 0.09
W/O Emulsion	0.40 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.01	5.9 $\pm$ 1.8	7.0	1.35 $\pm$ 0.21	0.67 $\pm$ 0.14
S/O Emulsion	0.35 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.01	12.1 $\pm$ 1.3	11.2	1.65 $\pm$ 0.32	1.12 $\pm$ 0.16

a Determined by radioactivity analysis.

b Determined by antimicrobial analysis.

c The mean  $\pm$  SE of at least five animals.

d The mean value of two groups (ten rats).

e The mean  $\pm$  SE of three animals.



後 30 分間に採取した胸管リンパ中濃度を両側定法で測定した値を整理した。表より明らかなように、血漿中濃度は測定法により著しい差が認められ、特に胃壁に注射した場合にはこの差は顕著で初回通過効果の寄与が示された。

所属リンパ節濃度においては、静脈内注射の場合には放射活性も低くしかも抗菌活性は全く検出されなかった。従って、循環血流から所属リンパ節への分布が著しく小さいことが明らかとなった。一方、胃壁に注射した場合の所属リンパ節中濃度には、二つの測定方法による結果の間に有意の差は認められず、注射部位すなわち胃壁から所属リンパ節へ移行する過程では代謝分解を受けにくいことが示唆された。

注射後 30 分間に胸管リンパ中に回収された放射活性は S/O 型エマルジョンがやや高い値を示したが、他の投与法においては有意の差は認められなかった。これは 30 分間のリンパを全量採取することにより、投与経路あるいは剤形による直接移行や循環血流からリンパ系への移行速度の差が相殺され平均化された結果を示すものと考えられる。5-FU ( $^3\text{H}$ ) の代謝産物である 2-fluoro- $\beta$ -alanine ( $^3\text{H}$ ) は体内に長期間滞まることが Hurst<sup>89)</sup> によって報告されており、投与後一定時間後に血漿中あるいは胸管リンパ中に検出された高い放射活性はこの代謝産物によるものと推論される。

以上の知見より、5-FU は肝臓で速やかに代謝されるため投与経路や剤形の影響を顕著に受けることが明らかとなった。エマルジョンは 5-FU の分解を保護し、活性を保持した 5-FU を標的臓器であるリンパ節へ送り込むと共に持続的にそれを放出することによってその bioavailability を改善するものと思われる。また、エマルジョンのように持続的に 5-FU を放出する剤形では、代謝に飽和現象が見られる場合でも初回通過効果により代謝分解を受ける割合が高くなることが予想されるが、循環血流中の 5-FU は副作用発現に関与するので、こうした特性はむしろ剤形の利点となることが推察される。

#### 4-d 考 察

消化器の腺癌に有効なため繁用される 5-FU を用いてエマルジョンの効果を検討した。剤形の効果は S/O 型エマルジョンが最も顕著で、大腿伸筋と胃壁のいずれの投与部位においてもリンパ移行性と投与部位滞留性の著しい改善が認められた。

最近、消化器癌のリンパ節転移に対する効果の増強を目的として、5-FU の水溶液を直接胃あるいは大腸の漿膜下組織に注入しようとする試みがなされ、静脈注射した場合と比べて高いリンパ節中濃度が得られることが報告されている。<sup>90), 91), 92)</sup> そして Shunkla<sup>93)</sup> らは、この投与法の外科手術の併用療法としての有用性を臨床的に証明している。<sup>93)</sup> 投与経路の影響に関するこれらの報告は、本研究で得られた知見と良く一致し、今回設定した実験方法の妥当性が示唆された。またこの事実より、本研究で最もリンパ移行性を改善した S/O 型エマルジョンの効果は、臨床においても期待され得るものであることが示唆された。さらに S/O 型エマルジョンは、5-FU の代謝特性などを考慮した場合にも有利であると考えられ、以上の諸点より 5-FU の S/O 型エマルジョンの有用性が証明された。

以上、ラットを用いた基礎実験より、エマルジョン特に W/O 型エマルジョンを改良した S/O 型エマルジョンが、水溶性制癌剤のリンパ移行性を著しく改善することが明らかとなった。また、その機構はエマル

ションの油滴が運搬体として薬物をリンパ系に運び込むものであることが解明された。さらに従来の研究では取扱われることのなかった薬物のリンパ節中あるいはリンパ系全体における動態の一部とそれに関連する臓器特性が明らかとなり、生理学的立場からも有用な知見が得られたものとする。また以上の知見を通じて、本研究で確立した基礎実験系のリンパ移行実験法としての有用性が立証されたものとする。

## 第Ⅱ章 油中微粒子型エマルジョンの物理化学的性質とリンパ移行増大効果との関連

第Ⅰ章において、W/O型エマルジョンを改良したS/O型エマルジョンが制癌剤のリンパ移行性と注射部位滞留性を著しく改善し、制癌剤のdrug delivery systemとして有用であることを明らかにした。

エマルジョンは医薬品の剤形として種々の用途に用いられ、注射剤に限っても免疫感作に用いたFreundの adjuvant<sup>94)</sup>以来、最近では脂肪輸液、<sup>95)</sup>人工血液、<sup>96)</sup>あるいは持続性注射剤<sup>97)</sup>などに用いられ、drug delivery systemの材料としても注目を集めている。<sup>98)</sup>しかしながらエマルジョンは複数の成分の混合系として調製されるため、その物理化学的性状は複雑で製剤学的立場からも多数の研究がなされているがなお解明すべき点が多く残されている。S/O型エマルジョンは注射後最内相に制癌剤を包含した複エマルジョンとなり、この油滴が運搬体となって制癌剤を所属リンパ節へ運び込むものと考えられる。この一連の過程において、エマルジョンの安定性、薬物の放出性など製剤学的特性は薬物の油滴中への保持と密接に関連し、ひいては効果を左右する重要因子の一つとなっているものと予測される。一方、前章にのべたごとく剤形によって油滴のリンパ移行性に大きな差が認められることから、エマルジョンの界面化学的あるいはレオロジカルな物理化学的性質が生体側の条件と影響し合って、リンパ移行性に大きく関与していることも予想される。

本章ではS/O型エマルジョンの製剤学的特性について論述すると共に、リンパ移行性に関与する、生理学的小および物理化学的支配因子の解明を試み種々の検討を行った結果を考察する。

## Ⅱ－１ 油中微粒子型エマルションの製剤学的特性

エマルションは不均一系であり、熱力学的に不安定なことが大きな特徴となっている。それ故エマルションの安定性に関する研究は非常に多く、界面活性剤の種類、粒子径、分散相と連続相の比率、比重差、および粘度等多くの物理化学的要因と安定性との関連が報告されている。<sup>99)</sup> エマルションの安定性がリンパ指向性 drug delivery system としての効果と関連していることは言うまでもないが、同時に保存状態において安定な製剤を供給することも、臨床応用において、必要不可欠な条件と考えられる。こうした観点から S/O 型エマルションの製剤学的特性を、特にその安定性を中心に検討した。

### 1-a 粒度分布および安定性

エマルションの粒度分布の測定には、種々の方法が用いられているが、<sup>100)</sup> 本研究では、内部の水相に水溶性色素を溶かしたエマルションを調製し、顕微鏡写真を撮影した後計測して粒度分布および平均粒子径を求めた。

Fig. 31 は第 1 表に示した処方を用いて調製した S/O 型エマルションの顕微鏡写真で、また第 32 図は S/O 型エマルションと W/O 型エマルションの粒度分布を測定した結果を整理したものである。粒度分布はそれぞれ約 1800 個の粒子を測定して求めた。S/O 型エマルションでは Fig. 32 で明かなように、粒子径は比較的狭い範囲に分布し、平均粒子径は  $1.55\mu\text{m}$  であった。これに対し W/O 型エマルションの平均粒子

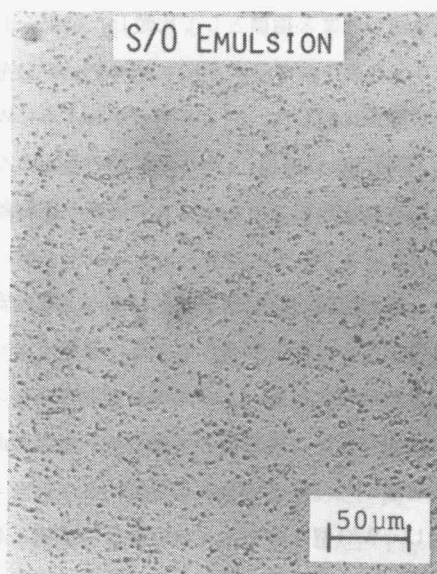


Fig. 31. Microphotograph of a S/O emulsion.

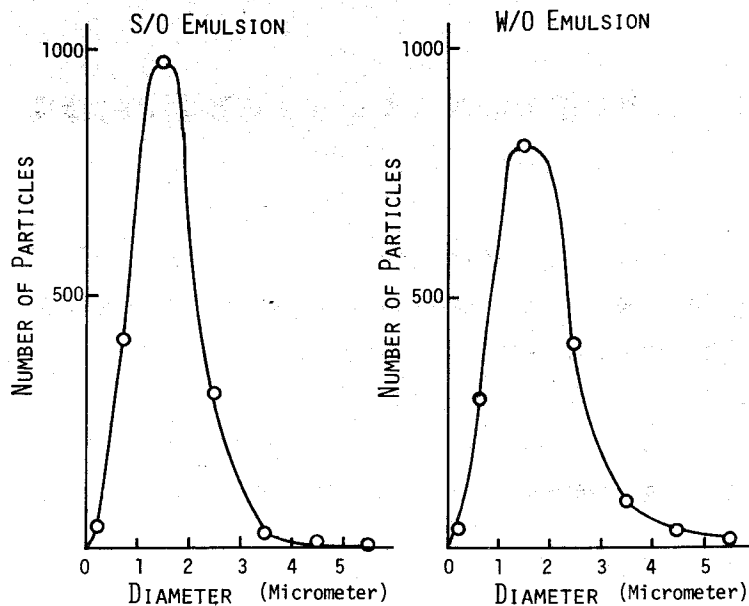


Fig. 32. Particle size distribution of S/O emulsion and W/O emulsion.

径は  $1.86\mu\text{m}$  で S/O 型エマルジョンより若干分散が悪いことが明らかとなった。

また、両エマルジョンをスライドガラス上に固定した標本を3日後に観察したところ、W/O 型エマルジョンの場合には粒子径の著しい増大が認められ、粒子の合一が進んでいることが示唆された。これに対し S/O 型エマルジョンの場合にはゼラチン微粒子の凝集は観察されたが合一は認められず、粒子間の相互作用に大きな関連を持つ安定性にも差異のあることが示唆された。

次にエマルジョンの安定性を相分離の速度を指標として比較した結果を Fig. 33 に示した。内径  $6\text{mm}$  の内部を清浄に洗ったガラス円柱に  $8.0\text{cm}$  の高さになるようにエマルジョンを充てんし密封した後、室温中で垂直に保持し、経時的に相分離の状態を比較した。図より明らかなように W/O 型エマルジョンの場合は、比較的速やかに相分離が始まり、12 時間後以降は、上から順に油のみからなる相、クリーム相、水のみからなる相の3相に分離した。これに対し S/O 型エマルジョンの場合の相分離は遅く、72 時間後でもごく一部分の油の分離を認めたのみであった。

一般に医薬品の保存においては、製剤技術的に問題が無ければ、主薬の安定化あるいは微生物汚染防止の観点から保存温度は低い方が良いと考えられている。しかし、凍結によってエマルジョンが破壊されることは幾つかの報告<sup>101), 102)</sup>によって知られており、この問題がエマルジョン保存技術上の課題となっている。こうした観点から、S/O 型エマルジョンと W/O 型エマルジョンを調製直後より  $-20^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫に1ヶ月保存し、解凍後その安定性を比較した。その結果、S/O 型エマルジョンでは、わずかにクリーミングが認められたのみであったのに対し、W/O 型エマルジョンの場合は水相と油相へのほぼ完全な分離が観察された。この事実より S/O 型エマルジョンでは冷凍操作を施してもほぼ安定性が保持されることが示された。

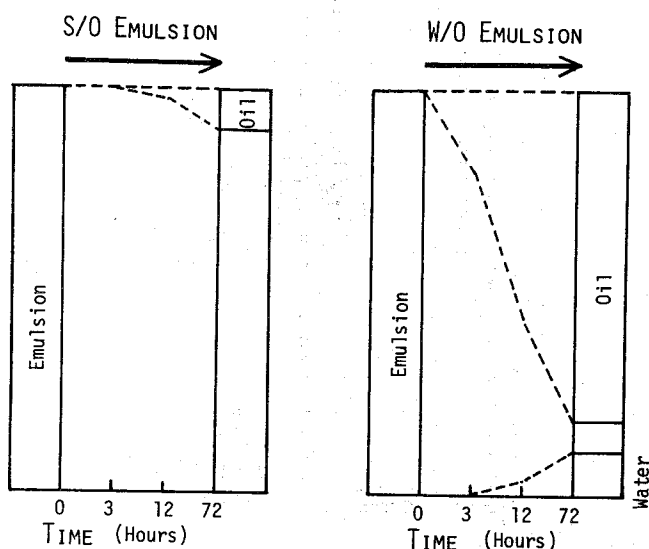


Fig. 33. Stability of S/O emulsion and W/O emulsion at room temperature.

## 1-b 薬物放出速度

Higuchi と Koizumi<sup>103)</sup> は W/O 型エマルジョンからの放出において、時間の平方根と放出量とが近似的に直線関係を与えることを報告している。また竹原<sup>104)</sup> は、内相の粒度分布と内相内の拡散を含むモデルを考え、理論的に解析しているが時間と放出量との間に同様な関係を見だしている。本研究では以上の報告を考慮して、Fig. 34 に示した装置を用い、セルロース膜を介して放出される薬物量を経時的に測定して放出速度を求めた。薬物としては<sup>3</sup>H でラベルした 5-FU を用いた。エマルジョンの内相および sink 層にはいずれも蒸留水を用いた。

Fig. 35(a) は S/O 型エマルジョンと W/O 型エマルジョンからの 5-FU の放出を示したものである。5-FU を水溶液の状態でセルロース膜上のセルに注入した場合の膜透過は非常に速く、時間の平方根と放出量との間に直線関係が得られた。S/O 型エマルジョンと W/O 型エマルジョンからの放出はこれに比べて著しく遅く、また前者の場合はプロット間により直線性が得られた。これに対し W/O 型エマルジョンの場合には時間が経過するにつれて放出が直線上よりも少しずつ速くなる結果が得られ、W/O 型エマルジョンの不安定性との関連が示唆された。しかしながら両エマルジョン間に著しい差異は認められなかった。

組織間隙に注射されたエマルジョンは、既に明らかにされたように組織間隙中で再分散されて複エマルジョンを形成している。こうした状態を in vitro で再現するために、両エマルジョンを 1%ゼラチン水溶液中に分散させて複エマルジョンを調製し 5-FU の放出を測定した。Fig. 35(b) に明らかなように、S/O 型エマルジョンを水に分散させた S/O/W 型エマルジョン及び W/O 型を水に分散させた W/O/W 型エマルジョンの双方とも、放出実験の初期には、水溶液からの放出と同程度の速やかな放出を示したが、放出は途

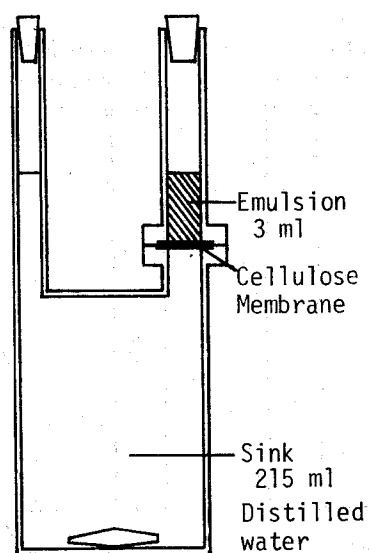


Fig. 34. Apparatus for determining a release rate of a drug from emulsion.

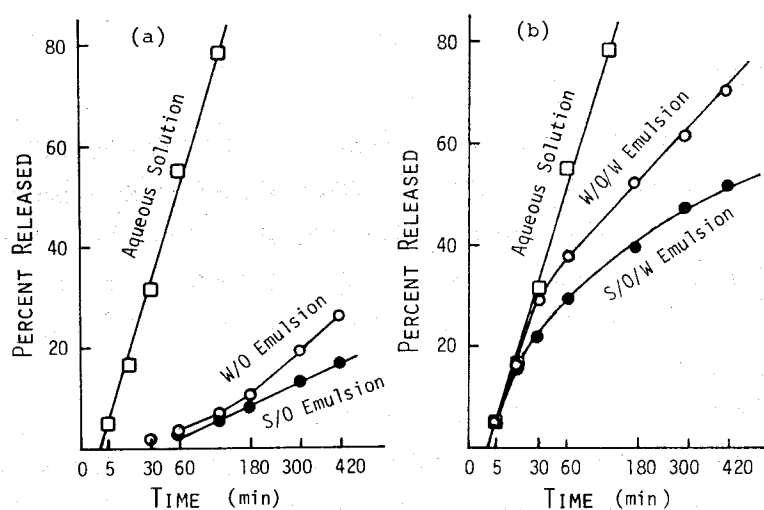


Fig. 35. In vitro release of 5-FU from various emulsions.

中から遅くなり、複エマルシヨンの最内相に包含された5-FUの放出が遅いことが示唆された。この放出様式は Brodin<sup>105)</sup>らが naltrexon の放出を調べた結果と良く一致した。また、両エマルシヨンの比較ではS/O/W型エマルシヨンの方がより安定であることが示唆された。

### 1-c 考 察

S/O型エマルシヨンとW/O型エマルシヨンの製剤学的特性を比較した結果、前者の方が安定性に優れ、

また薬物の保持にも勝ることが明らかになった。S/O型エマルションは、70-80℃の温度でゼラチン水溶液を油相中に超音波振動により分散させた後、引き続き振動を続けながら温度を0℃付近まで急冷させてゼラチンゲルの微粒子を形成させた剤形である。すなわち本剤形ではゼラチン水溶液のゾルからゲルへの変化を利用して、内相を一定の固さと形状を有する微粒子としている。エマルションの破壊は分散相の合一によって進行すると考えられるが、本剤形では分散相が上記の理由により固型粒子的特性を有しているので合一が進まず安定性が増しているものと推察される。エマルションの形態変化を顕微鏡下で観察した結果は、この推測を支持するものであった。外観変化における安定性に関しては、粒子の合一の問題以外に、ゲル微粒子間の接合による安定な足場構造の構築が寄与している可能性も考えられる。また、凍結による破壊を受けにくい点については、ゲル中では氷晶の成長が抑制されることが影響しているものと推測される。こうした製剤学的特性を反映して、S/O型エマルションではクリーミングが起っても、振とうにより速やかに原状に復帰し、実用的側面からも極めて有利な剤形であることが示された。

一方、S/O型エマルションとW/O型エマルションからの薬物の放出には大きな差は認められなかったが、複エマルションからの放出を比較するとS/O/W型エマルションの放出が遅く、薬物が安定に保持されていることが明らかとなった。この結果は既に示したS/O型エマルションによる制癌剤の注射部位およびリンパ節滞留性増大の結果と対応し、エマルション中に薬物が安定に保持されることにより、drug delivery systemとしての効果が増強されることが示された。

エマルションの安定性あるいはエマルションからの薬物の放出性に関しては非常に多くの因子が関与していることが知られている。<sup>99)</sup> 本研究におけるS/O型とW/Oの性状の差に関しては、表2に明らかなようにゼラチンの添加以外には処方に差がないことから、既に述べたようにゲルの微粒子の形成が最も重要な因子と考えられ、他の要因はこの問題に付随して影響し合っているものと予想される。最近Kumanoらはアミノ酸と界面活性剤より成るゲルを利用して安定なW/O型エマルションを得る方法を開発し、ラメラ構造を作ることによって水滴の合一が防げられると報告している<sup>106)</sup>が、本研究で開発した方法はより簡便に安定な油中水型エマルションを作る方法として、実用的にも幅広い応用が可能な剤形と考えられる。



## Ⅱ-2 油脂のリンパ移行に及ぼす剤形の物理化学的性質の影響

筋肉内注射あるいは皮下注射された薬物の吸収に対する生体側要因や溶液の物理的性質の影響に関しては Ballard の総説<sup>28)</sup>を始めとして、薬剤学的立場よりしばしば取り上げられている。しかし、注射剤の溶剤あるいは剤形自身の移行を取扱った研究は油性注射を扱った 2, 3 の研究を除くと非常に少なく、とりわけ物理的性質との関連を検討した報告はほとんど見当たらない。

制癌剤の運搬体となる油滴のリンパ移行が剤形によって著しく異なることは既に明らかとなったが、この現象は物質のリンパ移行を制御する生体側要因と剤形の物理化学的性質の相互作用によって規定されると考えられる。第Ⅰ章において注射部位としてラットの大腿伸筋と胃を用いたが、特に前者は多くの研究に用いられ、<sup>59), 60), 61), 65)</sup> 実験手技が確実なことから、油滴のリンパ移行機構の解明に適当なモデル注射部位と考えられる。それ故、大腿伸筋を用い種々注射条件を変えて各剤形を注射した際の、油滴の移行を詳細に検討し、移行に関与する基礎的要因を明らかにすると共に、剤形間の効果の差に影響する物理化学的性質についても若干の検討を行った。

### 2-a 油脂の移行に及ぼす注射容量の影響

注射条件の一つとして、注射容量が注射薬物の吸収速度に影響を与える場合のあることが知られているので、<sup>28)</sup> エマルションあるいは油単独の形で注射された油脂の移行に及ぼす注射容量の影響を、ラットの大腿伸筋をモデル投与部位とし、第Ⅰ章と同様の実験手技を用いて検討した。

Fig. 36 は、ゴマ油の注射容量を 10, 20, 50  $\mu\text{l}$  と変化させて大腿伸筋に注射した際の、油脂の注射部位からの消失を比較したものである。既に Fig. 4 の結果よりエマルションと比較して、ゴマ油単独で注射した場合に油脂の消失が最も速いことが明らかとなっていたが、その消失も注射容量の影響を大きく受け、注射容量が大きい程、注射後初期の消失速度が大きいことが明らかとなった。また Fig. 4 および Fig. 36 に示された、注射部位からの油脂の消失および Fig. 5 に示した所属リンパ節への油脂の移行の経時変化が、注射後 6 時間目以降ほぼ一定になることから、以後の実験では、注射後 6 時間目における消失およびリンパ移行を各剤形ごとに注射容量を変えて比較した。

Fig. 37 は、ゴマ油を単独の形で、あるいは S/O 型と W/O 型の剤形で注射した後 6 時間における油脂の消失率を、注射容量を 10  $\mu\text{l}$  から 50  $\mu\text{l}$  の間で変化させて比較したものである。S/O 型エマルションと W/O 型エマルションの場合は 6 時間後の消失は最高でも約 10% と少なく、注射容量の影響も認められなかった。一方ゴマ油の場合も、10  $\mu\text{l}$  と 20  $\mu\text{l}$  の注射容量では消失は遅くエマルションと同程度であった。しかしながら、30  $\mu\text{l}$  以上の注射容量では消失は著しく増加し、エマルションの場合と異って注射容量の影響を著しく受けることが明らかとなった。

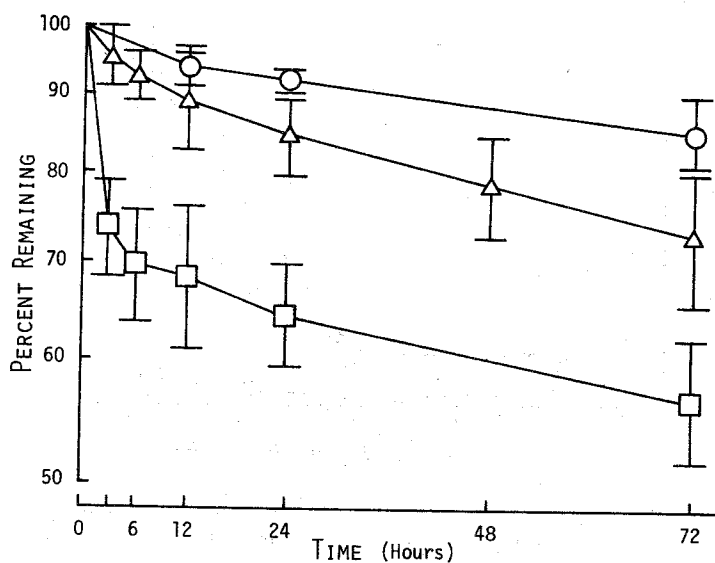


Fig. 36. Disappearance of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin from the thigh muscle after injection of various injection volume of sesame oil. ○, 10  $\mu\text{l}$ ; △, 20  $\mu\text{l}$ ; □, 50  $\mu\text{l}$ . Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of five animals.

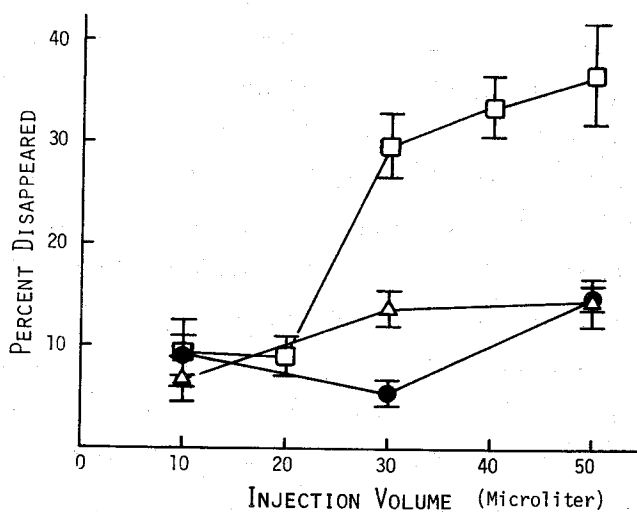


Fig. 37. Effect of injection volume on the disappearance of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin from the thigh muscle after injection of various oil formulations. □, oily solution; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

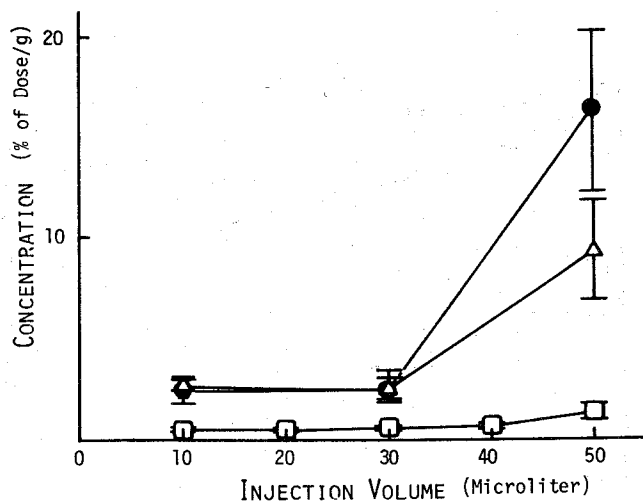


Fig. 38. Effect of injection volume on the lymphatic transfer of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin from the thigh muscle at six hours after injection of various oil formulations. □, oily solution; △, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of least five animals.

Fig. 38は同じ実験において、所属リンパ節中の油脂濃度を比較したものである。ゴマ油をそのまま注射した場合には注射容量の大小にかかわらず油脂はほとんどリンパ節へ移行せず、油単独ではリンパ移行性が著しく悪いことが明らかとなった。これに対し両エマルションは10 $\mu\text{l}$ の注射容量でもゴマ油単独の場合の約5倍のリンパ移行率を示しさらにこの値は注射容量を増した時顕著に増大した。特に注射容量を50 $\mu\text{l}$ とした時S/O型エマルションは注射容量10 $\mu\text{l}$ の時の約6.5倍のリンパ移行率を示し、エマルションのリンパ移行が著しく注射容量の影響を受けることが明らかとなった。

以上の知見より、ゴマ油を基剤とする剤形を注射後の油脂の移行が注射容量の影響を大きく受けることが明らかとなり、注射容量に関連した生理的条件が油脂の移行の支配因子の一つとなっていることが確かめられた。またゴマ油単独の場合とエマルションの場合とで、注射容量の影響の内容が異なり、剤形の物理化学的性質がこの因子に複雑に関連していることが示唆された。

次に、ゴマ油単独で注射した場合の油脂の移行実態をより明確にするために、ゴマ油に脂溶性色素 sudan blue を溶かし、注射後の色素の移行を追跡した。Fig. 39は、sudan blue のゴマ油溶液を10 $\mu\text{l}$  および50 $\mu\text{l}$ の注射容量を用いて、注射した後の注射部位における色素の消失の経時変化を示したものである。図より明らかなように、色素の消失はFig. 36に示したゴマ油の消失のパターンとよく一致し、色素がゴマ油に付随して移動していることが示唆された。sudan blue を溶かしたゴマ油を注射後6時間後に色素すなわち油脂の移動を肉眼的に調査した結果、注射部位の針穴からの色素の漏出は認められず、油脂が他の経路で大腿伸筋から消失したことが示唆された。筋肉を摘出すると、注射容量を50 $\mu\text{l}$ とした場合には筋膜に沿って油脂が広がっているのが観察され、一部はそ径部を通して臀部に移動していることが確かめられた。

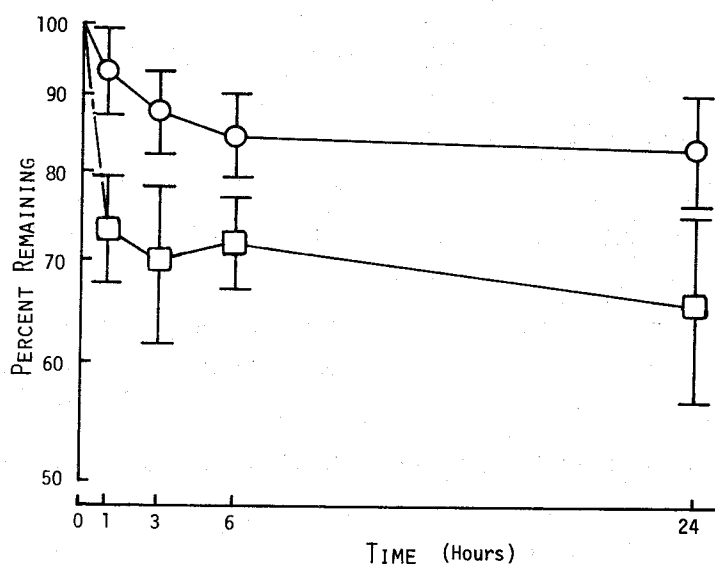


Fig. 39. Disappearance of sudan blue from the thigh muscle after injection of various injection volume of oily solutions.  $\bigcirc$ , 10  $\mu$ l;  $\square$ , 50  $\mu$ l. Results are expressed as the mean $\pm$ SE of at least five animals.

次に、 $^{14}\text{C}$ でラベルしたトリパルミチンをトレーサーとして溶かしたゴマ油を50 $\mu\text{l}$ 注射し、6時間後における体内分布を検討した。Table 9に示されるように、注射されたトリパルミチンは肝臓を始めとして各臓器に分布していることが明らかとなった。この結果はGoldmanらの報告<sup>107)</sup>によるトリパルミチンを静脈内注射した際の分布と比較的一致し、注射された油脂の一部が、血流を介して全身に分布することが示唆された。

以上の知見より、ゴマ油を単独の形で注射した場合は、油脂は注射部位より速やかに消失し、その消失

Table 9. Tissue Distribution of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin at Six Hours after Intramuscular Injection of Sesame oil.

Tissue	Concentration (% of dose /g)	Total recovery (% of dose)
Muscle (Site of administration)	—	69.69 $\pm$ 5.23
Plasma	0.04 $\pm$ 0.01	—
Liver	0.28 $\pm$ 0.04	2.49 $\pm$ 0.26
Spleen	0.10 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02
Lung	0.10 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.03
Kidney	0.12 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.06
Recovery in respiratory $\text{CO}_2$	—	1.28 $\pm$ 0.32

Results are expressed as the mean $\pm$ SE of five animals.

部分は近傍の組織あるいは血流を介して全身に分布してリンパ節へ直接移行する部分は小さいことが明らかとなり、エマルションとの移行動態、とりわけ注射容量の影響における差違が明確になった。

## 2-b 注射部位の機械的圧迫の影響

一般に注射後、注射部位をマッサージすると薬物の吸収が促進されリンパ移行も増大することが知られている。<sup>108)</sup> 各剤形における油脂の吸収およびリンパ移行の機構の詳細を検討する目的で、各剤形を注射した後、大腿伸筋を5分間軽くマッサージし、注射部位からの消失(a)とリンパ移行に及ぼす影響(b)を調べた。今までの実験結果においていずれの剤形でも  $10\mu\ell$  の注射容量では注射部位からの消失率とリンパ移行率が最も小さく、剤形間の差も小さかったことから、この注射容量を用いてマッサージによる機械的圧迫の効果を検討した。

Fig. 40 に明らかなように、各剤形を注射後マッサージ操作を加えることによって、注射部位からの消失

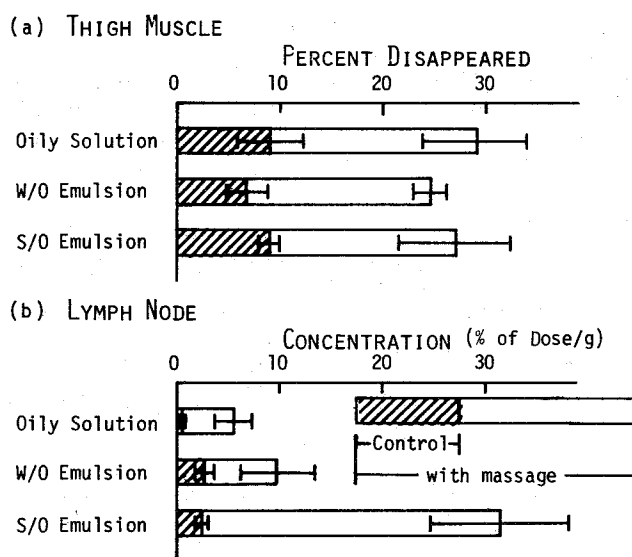


Fig. 40. Effect of massage on disappearance (a) and lymphatic transfer (b) of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin at six hours after intramuscular injection of various oil formulations. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least five animals.

はいずれの剤形でも無処置と比較して約3倍増加した。これに対してリンパ移行率はエマルションの場合マッサージによって著しく増加し、特にS/O型エマルションにおいて顕著であった。このように、機械的圧迫を大腿伸筋に加えた時の影響は注射部位からの消失とリンパ移行の間で異なり、両過程を支配する生体側因子が異なることが示唆された。

大腿伸筋にマッサージという機械的圧迫を加えることによる影響の一つとして組織内圧の上昇が考えられる。Fig. 40 に明らかなように S/O 型エマルションを注射後マッサージを施すことによって、注射容量

を増加させた場合と同様のリンパ移行率増大効果が認められ、また一方注射容量の増加も組織内圧上昇を導くと予想されることから、組織内圧がエマルションの油滴を毛細リンパ管中へ送り込む駆動力になっていることが示唆された。しかしながら同様に組織内圧が上昇していると予想される状態でも、ゴマ油単独の形で注射された場合のリンパ移行率は小さく、剤形の物理化学的性質がこの過程に大きく影響していることが明らかとなった。

一方注射部位からの消失はいずれの剤形でもマッサージによって同程度に増大し、リンパ系以外への移行が促進されていることが明らかとなった。Shaffer<sup>109)</sup>の報告によると、筋肉注射された油脂は注射後5分間程度の間に筋膜に沿って除々に結合組織や他の筋肉の方に移動すると言われている。この時期にマッサージを加えると、こうした油脂の伸展が促進されると考えられ、この油脂の伸展がリンパ系以外への油脂の移行における律速過程となっていることが推測された。ゴマ油を単独で注射した場合には注射容量の増加に伴ってこうした油の伸展が促されると想像され、これに対してエマルションでは注射容量に関してこのような現象は認められず、この点に関しても剤形の物理化学的性質が油脂の移行に関与していることが示唆された。

## 2-c 油脂の移行と物理化学的性質との関連

生体内に注射された油脂の移行に影響を及ぼすと予想される物理化学的因子はいくつかあるが、各剤形が生体内で液体としての挙動をとると考えられることから、界面化学とレオロジーの二つの立場から物理化学的性質と移行の關係に検討を加えた。

ゴマ油あるいはエマルションを注射すると油滴に分散することは既に述べたが、この際油脂と体液との間に作用する界面張力が分散に大きく影響していると考えられる。S/O型あるいはW/O型エマルションを調製する際は、連続相となるゴマ油に乳化剤としてHCO-60とSO-15の二種類の非イオン性界面活性剤を添加しているが、これらの界面活性剤が組織間隙中における油水界面の界面張力を下げ油滴の分散にも影響している可能性が考えられるので、ゴマ油にこれらの界面活性剤を添加した場合の影響を調べた。

Fig. 41はゴマ油にこれら界面活性剤をエマルション調製の際と同じ濃度で添加した際の注射部位からの消失(a)とリンパ節濃度(b)を、ゴマ油単独で注射した場合と注射容量を変えて比較したものである。図より明らかなように、界面活性剤の添加により消失は減少し一方リンパ移行は増大した。又この効果は注射容量が大きくなる程顕著に現われ、エマルションの場合と非常によく似た傾向を示した。この事実からエマルションがリンパ指向性を持つ理由として界面活性剤の存在の寄与が強く示唆された。この活性剤の効果をより明確にする目的で、各剤形および界面活性剤を添加したゴマ油の空気に対する表面張力と、水に対する界面張力をDu Nouy型張力計を用いて測定し結果をTable 10.に整理した。

表面張力においてはゴマ油と両エマルションおよび界面活性剤を添加したゴマ油の間に大きな差は見られず、界面活性剤存在の影響は認められなかった。これに対し水に対する界面張力に関してはゴマ油単独の場合と比較してエマルションおよび界面活性剤を添加したゴマ油は著しく低い値を示し、界面活性剤の存在により水に対する界面張力が著しく低下していることが確かめられた。

さらに界面活性剤添加の影響を組織学的に検討する目的で、各剤形を注射後1時間後に筋肉を摘出し、

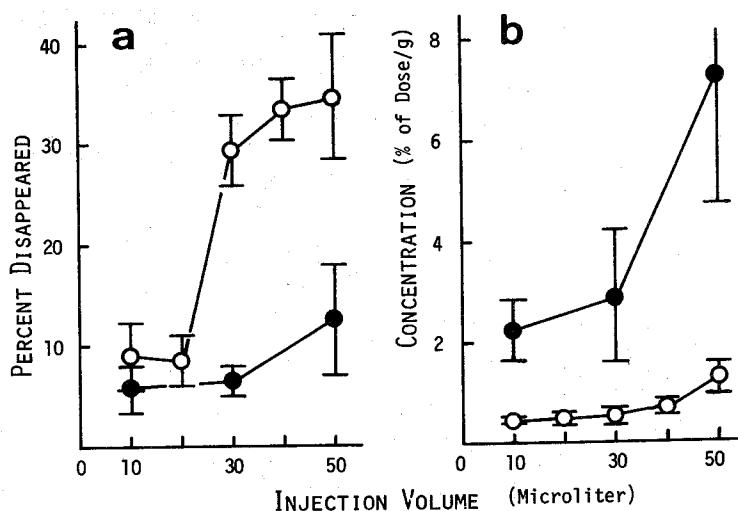


Fig. 41. Effect of the addition of surface-active agents on the disappearance (a) and the lymphatic transfer (b) of  $^{14}\text{C}$ -tripalmitin at six hours after intramuscular injection. ○, Sesame oil; ●, sesame oil+surface-active agents. Results are expressed as the mean $\pm$ SE of at least five animals. Surface-active agents; SO-15(6.6%)+HCO-60(1.7%).

Table 10. Surface Tention and Interfacial Tention against Water of Various Oily Vehicles at 25°.

Substance	Surface Tention (dyn/cm)	Interfacial Tention against Water (dyn/cm)
Sesame oil	34.9	26.2
Sesame oil + Surface Active Agents (SO-15, HCO-60)	34.9	2.5
W/O Emulsion	34.7	1.5
S/O Emulsion	35.0	1.5
Water	71.3	—

Instrument ; Du Nouy tentiometer.

凍結切片を作って弱拡大で顕微鏡観察を行った。Fig. 42はゴマ油とS/O型エマルジョンを注射後の組織切片の顕微鏡写真であるが、ゴマ油を注射した場合は油は筋肉間を帯状に広がり一部は大きな depot を形成していた。これに対しS/O型エマルジョンの場合は、エマルジョンは細かい油滴に分散し組織間隙に存在している像が観察された。またW/O型エマルジョンや界面活性剤を添加したゴマ油でも同様の結果が認

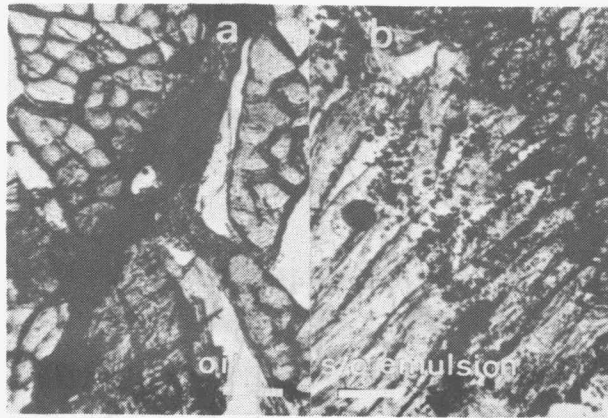


Fig. 42. Photomicrographs of the thigh muscle after intramuscular injection of sesame oil (a) and S/O emulsion (b). oil phase was colored by dissolving sudan blue prior to injection. Photo. A, B;  $\times 100$ .

められ、界面活性剤の存在により組織間隙中における油滴の分散が著しく促進されることが証明された。以上の実験の結果、組織間隙中で細かく分散することがエマルションがリンパ系に移行するための必要条件と考えられ、その際油水界面の界面張力が支配因子の一つとして影響していることが示された。一方ゴマ油は細かく分散できないので大きな depot を作り、筋膜に沿って広がって近傍の組織あるいは血流へ移行するものと想像される。

さらに各剤形のレオロジカルな特性を明らかにするために、コーンプレート型粘度計を用いて各剤形の流動特性を検討した。Fig. 43 の(a)は各剤形ごとのレオグラムを示し、また(b)には計算した粘度の値をずり速度に対してプロットした。図より明らかなように、ゴマ油はニュートン流動を示しその粘度は 8.1cp であった。これに対して S/O 型エマルションと W/O 型エマルションはチキソトロピーを示し、非ニュートン液体であることが明らかとなった。両者を比較すると S/O 型エマルションの方が常に大きな粘度を与えた。チキソトロピーの性質はエマルションの静置状態における安定性を高める方向に作用すると考えられ、S/O 型エマルションの方が W/O 型エマルションよりも保存に対して安定であった事実の一端を説明するものと思われる。一方、注射時すなわちエマルションが注射針中を通過する過程ではずり速度が非常に大と考えられるので、粘度は最小になり流動・分散に対する抵抗も小さくなっていることが予想される。この特性もリンパ移行の立場からは有利な条件と言えよう。また、ずり速度が小さい時、S/O 型エマルションが W/O 型エマルションと比較して著しく大きな粘度を与えることから、組織間隙中に分散した油滴の硬さや表面の流動性に差が生じている可能性が示唆され、これらが両エマルションのリンパ移行性に関与していることが推論された。



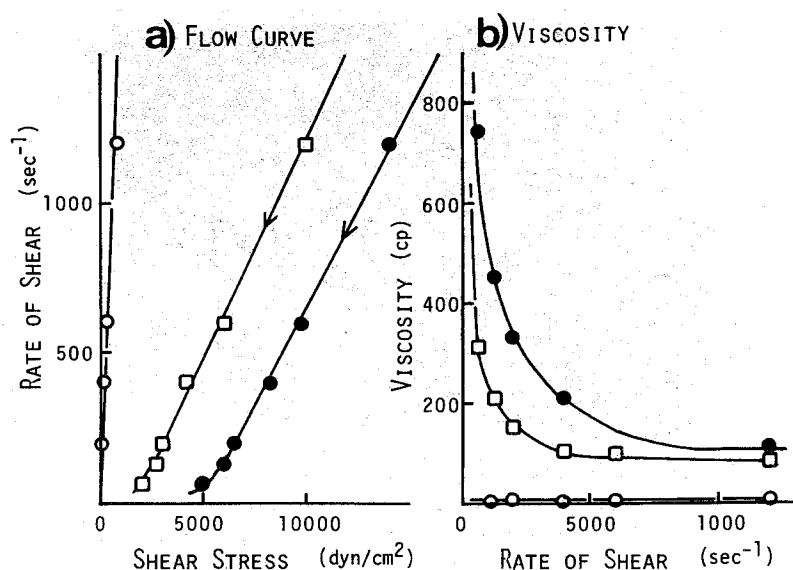


Fig. 43. Rheological flow curves and viscosity of various oily vehicles at 25°. ○, Sesame oil; □, W/O emulsion; ●, S/O emulsion. Instrument; electrical rotary viscometer "ROTOVISCO" (cone and plate method).

## 2-d 考 察

大腿伸筋をモデル注射部位として、制癌剤の運搬体となるエマルションの油滴の移行機構を検討し、移行を支配する生理学的因子と剤形の物理化学的性質の影響の解明を行った。

注射条件を変えて各剤形を注射後の油脂の移行を追跡した結果、注射容量を増加させたり注射後局所に機械的圧迫を加えることによってS/O型エマルションのリンパ移行が著しく増大したことから、組織内圧の上昇がエマルションのリンパ移行の駆動力となっている可能性が示唆された。一方ゴマ油単独を注射した場合、注射容量の増加および機械的圧迫は油脂のリンパ移行には殆んど影響を与えず、組織近傍あるいは循環血流への移行を顕著に促進し、エマルションの場合とは移行機構が異なることが証明された。

こうした剤形間における移行の差を支配する要因の解明を目的として、ゴマ油に界面活性剤を添加し移行を追跡した結果、エマルションの場合とよく似た結果が得られたことから、乳化剤として用いた界面活性剤の寄与が大きいことが示唆された。各剤形とゴマ油に界面活性剤を添加したものの水に対する界面張力を測定した結果、ゴマ油以外の試料では界面張力が著しく低下していることが明らかとなったことから、こうした剤形では注射後の組織間隙中における分散が著しく促進されていることが予想され、これは組織学的検索により確かめられた。以上の結果より、注射後の油脂の移行においては、組織間隙中で細かい油滴に分散することが第一条件であり、この際剤形の界面化学的特性が支配因子となっていることが解明された。またS/O型エマルションのレオロジカルな特性も、剤形としての安定性、およびリンパ移行性に影響している可能性が示唆され、S/O型エマルションとW/O型エマルションの効果の差がこうした物理化学的性質の差によることが明らかとなった。

### 第Ⅲ章 油中微粒子型エマルジョンの臨床応用 に関する検討

生物薬剤学的立場に基づいて、新しい剤形を開発し臨床応用に供するためには、薬物の生体内挙動あるいは bioavailability に対する剤形の効果を詳細に吟味することが重要であるが、同時に製剤技術的あるいは安全性の側面からも種々検討を加える必要がある。第Ⅰ章において、制癌剤のリンパ移行性を改善する製剤学的修飾法の開発を試み、W/O型エマルジョンを改良した S/O型エマルジョンが薬物のリンパ系内濃度を著しく高めることをラットを用いた基礎実験より確めた。また第Ⅱ章では、S/O型エマルジョンの製剤学的特性について種々検討を行い、この剤形が製剤としての安定性、薬物の保持性に優れ製剤技術面からも有用であることを明らかにすると共に、その物理化学的性質が運搬体としてのリンパ系への侵入過程にも有利に作用していることを証明した。一方、安全性の立場からも、S/O型エマルジョン処方中に用いた各物質は安全性を保証されたものであると考えられ、以上の諸点を総合して S/O型エマルジョンの臨床応用の可能性が示唆された。

本章ではこれらの知見に基づいて、S/O型エマルジョンの臨床応用の可能性を具体的に検討することを目的として、二種類の試みを行った。すなわち、家兎を用いて癌のリンパ節転移のモデルを作成し、外科手術併用化学療法として bleomycin の S/O型エマルジョンの効果を検討した。また、エマルジョンの応用の拡大を目ざして、同一製剤を小児リンパ管腫の治療に使用しその全例に効果を認めた。以下にその結果を論述する。

### Ⅲ-1 家兎リンパ節転移モデルに対する治療効果

消化器癌の再発形式の中でも頻度の高いリンパ行性転移に対して、通常外科手術療法では局所リンパ節廓清術と称して、原発腫瘍の周辺のリンパ節群を清掃する術式が施行されている。しかし術中にすべてのリンパ節転移巣を識別し取り除くことは不可能であり、局所再発の原因の多くは取り残された転移巣にはじまることが多いと考えられている。<sup>6), 110)</sup> そこで外科手術に際して、補助療法として制癌剤を原発腫瘍およびリンパ節転移巣に高濃度に行き渡らせることはきわめて有意義なことと考えられる。<sup>111)</sup>

本研究においては、S/O型エマルジョンの剤形を用いて水溶性制癌剤を局所に注入することによって、注入局所および所属リンパ節に制癌剤を高濃度に滞留させることができることをラットを用いた基礎実験によって明らかにした。この実験において、胃壁を注入部位とした場合の方が効果が顕著であったことから、消化器癌に対する本剤形の有用性が示唆された。そこで家兎を用いて実験的にリンパ節転移のモデルを作製し、臨床における外科手術と同様に、原発腫瘍を摘出すると同時に残存リンパ節転移巣に対して、bleomycinのS/O型エマルジョンを用いて化学療法を施し、リンパ節転移に対する効果を検討した。<sup>112)</sup> 以下にその実験方法と結果を論述する。

#### 1-a リンパ節転移モデル作製法および実験法

リンパ節転移巣に対する化学療法の効果を評価する目的で、Tsukagoshiら<sup>113)</sup>は白血病L<sub>1210</sub>を移植したマウスを用い、徳山<sup>114)</sup>はラットの尾部に吉田肉腫を移植してリンパ節転移モデルを作製している。しかしながら外科手術の併用療法としての効果を評価するためにはできる限り臨床に近いモデルを作成する必要があるため、本研究では実験動物に家兎を用い、VX<sub>2</sub>腫瘍を消化器のモデルとして選んだ虫垂に移植した後、臨床操作を模した外科的切除術を施して主腫瘍を摘出しモデルリンパ節転移を作製した。

VX<sub>2</sub>腫瘍はShope Papilloma由来の扁平上皮癌で、特にリンパ行性転移傾向の強い移植腫瘍とされている。<sup>115)</sup> Engzellらの報告<sup>116)</sup>によれば、リンパ管に注入されたVX<sub>2</sub>腫瘍細胞はリンパ節に捕捉されそこで転移巣を形成するとされ、以上の事実よりVX<sub>2</sub>腫瘍はリンパ節転移を作成するのに好都合な腫瘍と考えられる。また、解剖学的にリンパの流路が単純である虫垂を消化器のモデルとして選択した。制癌剤は扁平上皮癌に著効を示し、VX<sub>2</sub>腫瘍に対する効果も報告されている<sup>117)</sup> bleomycinを用いた。

Fig. 44には、リンパ節転移モデル作製のスケジュールを示した。家兎をpentobarbital麻酔下開腹し、1 ml中に約 $5 \times 10^6$ 個の細胞を含むVX<sub>2</sub>細胞の浮遊懸濁液を0.3 ml虫垂の中央部に移植しday 0とする。10日後には、Fig. 45のように直径約1 cmの腫瘍が移植部位に形成され、同時に虫垂根部にはほぼ全例にリンパ節転移ができる。この時点で腫瘍を含めて、虫垂の尾側半切除術を行うと同時に、残存する中根側虫垂壁内へbleomycin (3 mg/kg)の各種剤形を用いた局所療法を施行し、全身療法を施した群を含めてリン

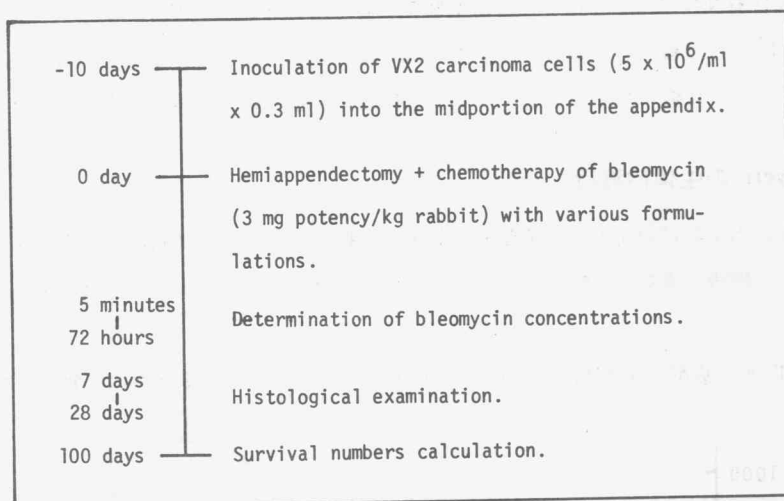


Fig. 44. Experimental schedule for testing an efficiency of adjuvant chemotherapy using bleomycin-S/O emulsion.

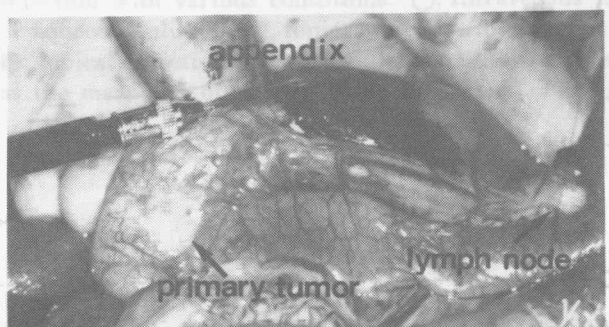


Fig. 45. Photograph of the appendix and the regional lymph nodes at ten days after inoculation of VX2 carcinoma cells.

リンパ節転移巣に対する効果を比較した。効果の判定は治療後各時点におけるリンパ節転移巣の組織学的検索および、担癌家兎の生存日数を指標に行った。また比較実験として、担癌および正常家兎に bleomycin を各剤形で注入した際の臓器内濃度を測定し、bleomycin 濃度と抗腫瘍効果の関連を検討した。

bleomycin は糖ペプチド構造を持ち、水溶性が高くエマルション製剤を調製するのに適している。実験には、bleomycin の剤形として S/O 型エマルション、W/O 型エマルション、水溶液、および油性懸濁液の四種類を用いた。この際、エマルションの基剤としてゴマ油の他、triocetanoïn (MCT-8) を用いた。MCT-8 は経口投与<sup>118)</sup>あるいは注射<sup>119)</sup>が可能で、しかも著しく粘度が低いことから臨床使用上好都合と判断した。

bleomycinの油性懸濁液は bleomycinの持続型製剤として開発された剤形で、生体内挙動<sup>120)</sup> 抗腫瘍抗  
果<sup>121)</sup>、あるいは毒性<sup>122)</sup> など種々の点において従来の bleomycin 水溶液と異なることが報告されている。従  
って本実験でも、これを比較に用い、エマルジョンの特性を一層明確にすることを試みた。

### 1-b bleomycin の生体内移行

bleomycin の生体内挙動に対する、各種剤形の効果を比較するために、はじめに正常家兎を用いて、注  
射後の bleomycin の組織内濃度を比較した。測定は、B. Subtilis PCI-219 を用いた bioassay により行っ  
た。

Fig. 46 は MCT-8 を基剤とする bleomycin の S/O 型エマルジョンを虫垂壁内に注射した後の虫垂内濃

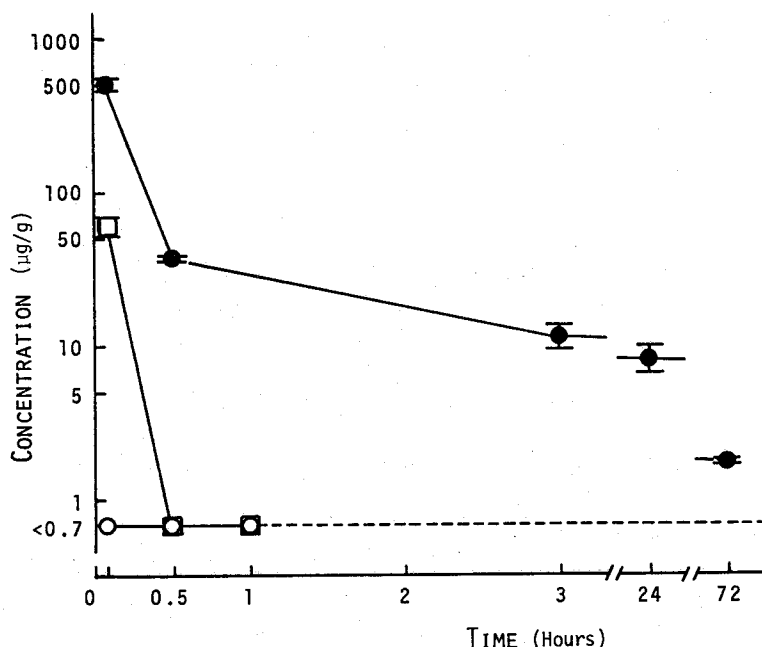


Fig. 46. Concentration of bleomycin in the appendix after injection with various conditions. ○, Intravenous injection of aqueous solution; □, topical injection of aqueous solution; ●, topical injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$ SE of at least three animals.

度を、bleomycinを水溶液の形で虫垂壁あるいは静脈内に投与した場合と比較したものである。S/O型エ  
マルジョンの剤形で注射した場合、虫垂壁内濃度は注射後5分に高い濃度を示し、その後も bleomycin は  
長時間滞留して72時間後もなお虫垂壁内に検出された。一方、水溶液を虫垂壁に注射した場合は、30分  
後以降 bleomycin は検出できず、吸収が速いことが示唆された。また、静脈内注射の場合には、測定可能  
な濃度の分布は認められなかった。

同じ実験において、所属リンパ節である虫垂根部のリンパ節中の bleomycin 濃度の経時変化を示したの

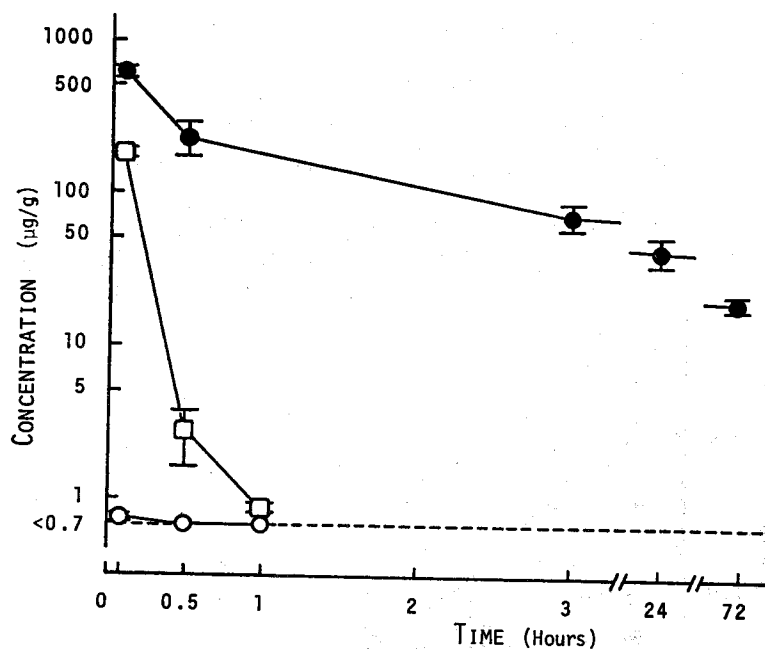


Fig. 47. Concentration of bleomycin in the regional lymph node after injection with various conditions. ○, Intravenous injection of aqueous solution; □, topical injection of aqueous solution; ●, topical injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least three animals.

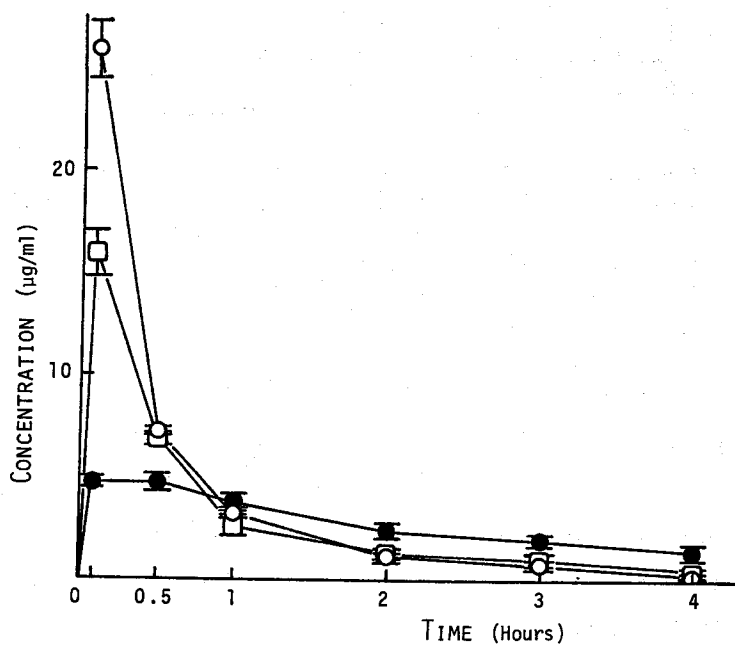


Fig. 48. Plasma concentration of bleomycin after injection with various injection conditions. ○, Intravenous injection of aqueous solution; □, topical injection of aqueous solution; ●, topical injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least three animals.

が Fig. 47 である。虫垂壁内濃度の場合と同様、bleomycin を S/O 型エマルジョンの剤形で投与すると高いリンパ節中濃度が長時間維持されることが明らかとなった。

Fig. 48 は同じく bleomycin の Plasma 中濃度を比較したものである。S/O 型エマルジョンの剤形で投与することにより、最高血中濃度の低下が認められるがこれは注射部位に長時間滞留することを反映しているものと推察された。

さらに同じ実験において、肺および肝、中の bleomycin 濃度を測定した。Fig. 49 には肺の結果を示し

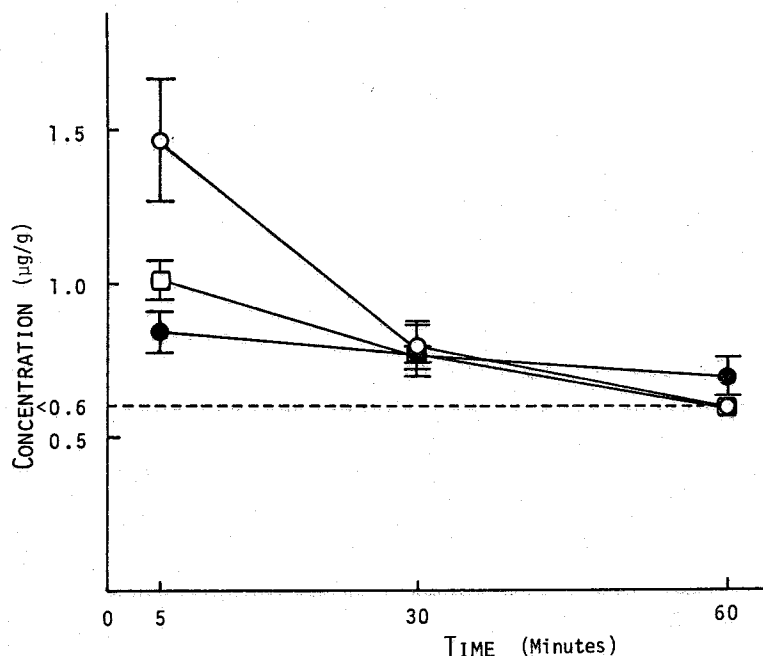


Fig. 49. Concentration of bleomycin in the lung after injection with various conditions. ○, Intravenous injection of aqueous solution; □, topical injection of aqueous solution; ●, topical injection of S/O emulsion. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE of at least three animals.

たが、bleomycin 使用の際最も副作用の現われ易い<sup>123)</sup> 肺においては剤形間に大きな差は認められなかった。また肝臓中にはいずれの剤形でも抗菌活性は測定できず、Ohnuma らの報告<sup>124)</sup> 同様肝臓における不活化が著しく速いことが示された。

以上の結果より、bleomycin を静脈内注射しても虫垂やリンパ節等への分布は小さいことが明らかとなった。また水溶液の形で局所注射した場合にも速やかに循環血流に吸収され、注射部位やリンパ節に十分な濃度の bleomycin を長時間滞留させることがむずかしいことが示された。これに対し S/O 型エマルジョンを剤形として用いることによって、bleomycin を必要な部位に長時間滞めることが可能であり、リンパ節転移の防止に有用であることが確かめられた。これらの剤形の効果は第 1 章で明らかにしたラットの場合と良い一致を示したが、家兎の方が効果がより顕著であった。

次にこの実験系を用いて、型および基剤の異なる各種剤形の bleomycin の移行に及ぼす効果を検討した。

Table 11 には bleomycin を各種剤形で投与した後、30 分後と 24 時間後の虫垂壁内とリンパ節内の bleomy-

Table 11. Bleomycin Concentrations in the Appendix and the Lymph Node after Topical Injection with Various Formulations.

Formulation (oil component)	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ wet tissue)			
	Appendix		Lymph node	
	30min	24hr	30min	24hr
S/O emulsion (MCT-8)	38.1 $\pm$ 4.3	8.3 $\pm$ 1.5	233.7 $\pm$ 60.0	45.0 $\pm$ 9.2
S/O emulsion (Sesame oil)	28.1 $\pm$ 4.6	6.1 $\pm$ 0.6	169.5 $\pm$ 18.1	18.2 $\pm$ 5.2
W/O emulsion (MCT-8)	22.0 $\pm$ 0.8	4.4 $\pm$ 0.8	121.9 $\pm$ 10.5	16.3 $\pm$ 1.6
oily suspension (Sesame oil)	47.2 $\pm$ 19.8	4.5 $\pm$ 0.4	8.8 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.2

Results are the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

cin 濃度を整理した。注射後 30 分後の虫垂壁内濃度は油性懸濁液が最も高く、この剤形が組織滞留性に優れるという報告と一致した。一方リンパ節濃度に関しては S/O 型エマルションが最も高い値を示し、これに対して油性懸濁液は最も移行が悪いことが示された。この結果は第 I 章および第 II 章においてラットを用いて油脂のリンパ移行を検討した結果と良く一致し、油性懸濁液にはリンパ指向性が乏しいことが証明された。W/O 型エマルションは常に S/O 型エマルションよりやや劣ることが示された。一方、S/O 型エマルションの基剤に MCT-8 を用いることによって、リンパ移行性がさらに改善されることが明らかとなった。これら各剤形の効果の差は、第 II 章で明らかにしたように各剤形の物理化学的性質の違いを反映したものである。

次に、正常家兎におけるこれらの剤形の効果が、担癌家兎においても適用され得るかどうかを調べる目的で、S/O 型エマルションを担癌家兎に腫瘍摘出と同時に注射した際の虫垂壁内およびリンパ節内濃度を測定した。Table 12 に示したように、担癌家兎と正常家兎の間で有意の差は見られず、S/O 型エマルションの効果は担癌家兎に対して外科手術と併用して用いても、同様に発揮されることが明らかとなった。

以上で明らかとなった S/O 型エマルションの効果を肉眼的に確認する目的で、S/O 型エマルションを Sudan blue で染色し、腫瘍近傍の虫垂壁内へ注入してその移行を追跡した。注入直後エマルションは、Fig. 50(a) のように注入部位のリンパ管に速やかに侵入し、さらにこれは腸間膜リンパ管を経て、(b) のように転移巣のある所属リンパ節に流入した。またこの途中において腸間膜リンパ管を破り、リンパ液を採取して顕微鏡で観察した結果、Fig. 51 のように複エマルションが多数浮遊していることが確認された。これらの事実より、担癌家兎の場合にも、ラットの場合と同様に S/O 型エマルションが複エマルション化した油滴が運搬体として制癌剤を所属リンパ節へ運ぶことが証明された。



Table 12. Bleomycin Concentrations at Thirty Minutes after Topical Injection with S/O Emulsion in Normal and VX2 Carcinoma Bearing Rabbit.

Animal	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ or $\text{g}$ )		
	Plasma	Appendix	Lymph node
Normal rabbit	$4.7 \pm 0.3$	$38.1 \pm 4.3$	$233.7 \pm 60.0$
VX2 bearing rabbit	$4.4 \pm 0.4$	$32.4 \pm 4.5$	$209.9 \pm 41.2$

Results are the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

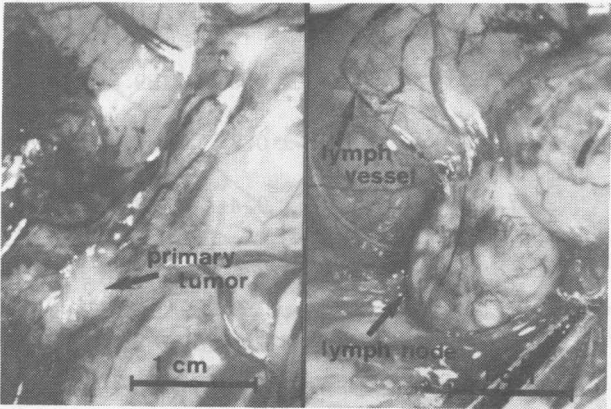


Fig. 50. Photographs of the primary tumor and the metastasized lymph node at immediately after injection of S/O emulsion into the appendix wall near the primary tumor. S/O emulsion (stained with sudan blue) intruded into the lymph vessels and drained into the lymph node.

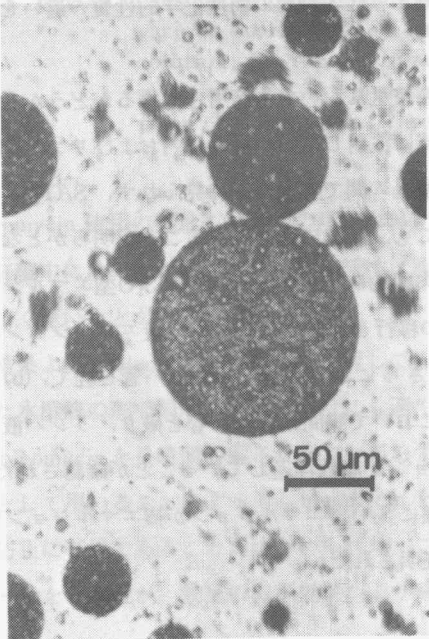


Fig. 51. Microphotograph of peripheral lymph fluid drained from the appendix which had an injection of S/O emulsion at the sub-serosal layer. Lipophilic dye ( sudan blue ) was dissolved in the oily phase of emulsion.

## 1-c リンパ節転移に対する抗腫瘍効果

bleomycin の VX2 腫瘍によるリンパ節転移巣に対する抗腫瘍効果を各剤形群において比較検討した。虫垂壁内への VX2 腫瘍細胞浮遊液の注入移植後 10 日において、既に所属リンパ節は一部肥大し、リンパ節転移が生じていることを肉眼的および組織学的に確認したので主腫瘍を摘出すると共に化学療法を施し、その効果を組織学的に検索した。

外科的に主腫瘍を摘出しただけで、化学療法を施さなかったコントロール群においては、例外なく Fig. 52(A) に示すようなリンパ節転移が認められた。(B)に明らかなように、転移巣では比較的大型で円形のク

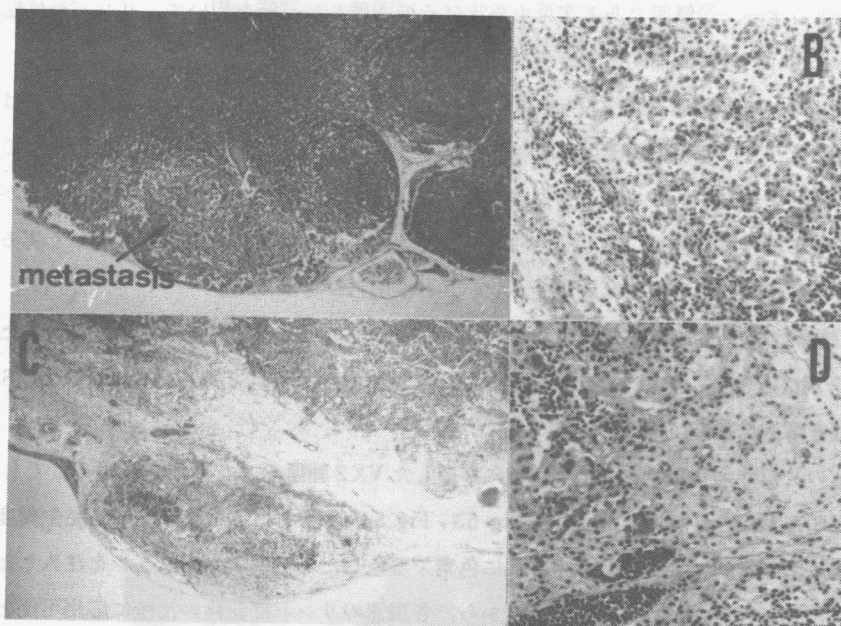


Fig. 52. Microphotographs of the metastasized regional lymph node at 1 week after excision of the primary tumor without any chemotherapy (A, B) and 1 month after surgical treatment and an adjuvant chemotherapy using bleomycin-S/O emulsion system. The excised lymph nodes were fixed in 10% formalin and stained with hematoxylin and eosin. Photo. A, C;  $\times 40$ . Photo. B, D,  $\times 200$ .

ロマチンに富んだ核を有する VX2 腫瘍細胞の増殖が観察された。手術後 1 週間では転移巣は主に辺縁洞に認められたが、これは随質に向けて浸潤性に拡大増殖してゆき、終局的にはリンパ節全体が腫瘍細胞の集団によって置換されるに至った。bleomycin を S/O 型エマルジョンの剤形を用いて投与した群においては、当初辺縁洞に着床した VX2 腫瘍細胞巣は Fig. 52(C)(D)のごとく異物巨細胞をはじめとした組織球系細胞の遊出、リンパ球を主体とした白血球浸潤、線維芽細胞、線維細胞の増生の像に置換しており、一部に残存する VX2 細胞は、核濃縮をきたして変性に陥っていた。bleomycin の水溶液を虫垂壁内に投与した群

では初期に一部の腫瘍細胞の変性が認められたが、4週間後には多くの場合転移巣の発育が観察された。bleomycinの静脈内注射群は、組織学的検索によれば無効であった。

一方、各治療群の生存日数を追跡した結果は組織学的検索と一致し、コントロール群3羽の平均生存日数が約50日であったのに対し、エマルション群では7羽中5羽が100日後においても生存し延命効果が認められた。

以上の結果、S/O型エマルションの剤形を用いてbleomycinを虫垂壁に注射した場合のみ、リンパ節転移巣に対して著明な抗腫瘍効果が認められ、本療法の外科手術併用療法としての有効性が証明された。

#### 1-d 考 察

リンパ液のドレナージが簡明である家兎虫垂及びその所属リンパ節を用いて、リンパ行性転移に対するエマルションを用いた外科的補助化学療法の可能性を実験的に証明した。

S/O型エマルションの剤形で局所投与されたbleomycinはそれが水溶液として局所あるいは全身性に投与された場合に比べて、極めて高濃度に所属リンパ節へ移行し、また節内滞留時間も延長することが明らかとなった。W/O型エマルションはS/O型エマルションよりも多少リンパ移行性に劣ることが示された。一方bleomycinの油性懸濁液は、最も高い注射部位滞留性を示したがリンパ移行は著しく劣ることが証明され、リンパ節転移防止の目的では有用性が低いことが明らかとなった。

家兎VX2腫瘍に対する抗腫瘍効果を、リンパ節転移巣の組織学的検索と延命効果で評価したが、bleomycin 3mg/kgを水溶液として全身または局所に投与した例では全て無効であったのに対して、S/O型エマルション群では寛解例を高率に認めた。

bleomycinのS/O型エマルションは食道壁に移植したVX2腫瘍のリンパ節転移に対しても抗腫瘍効果を示すことが明らかにされており、さらにFig. 53, Fig. 54に示すように臨床的に癌発生頻度の高い人の胃および直腸に解剖学的によく似た犬の各部に色素で着色したS/O型エマルションを注入した結果、速やかに所属リンパ節への流入が認められることから、各臓器のリンパ節転移の治療に応用可能と考えられる。既に高橋ら<sup>125), 126)</sup>によってヒトの胃癌の外科手術の補助療法にW/O型エマルションが用いられ、良好な結果が収められていることは、S/O型エマルションの有用性をさらに保証するものであろう。

以上の知見より、S/O型エマルションの制癌剤のdrug delivery systemとしての有用性が強く示唆された。

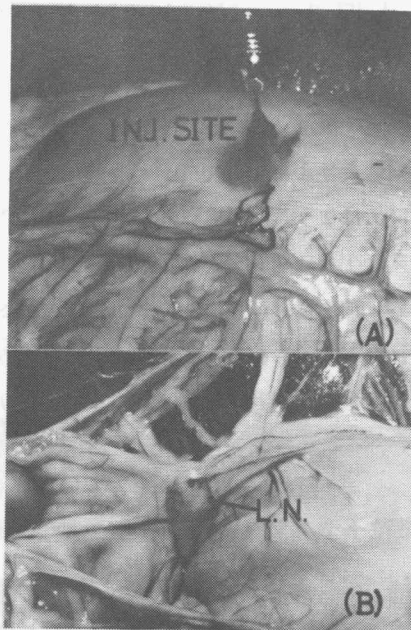


Fig. 53. Photographs of the stomach wall and the regional lymph node of the dog at immediately after injection of S/O emulsion.

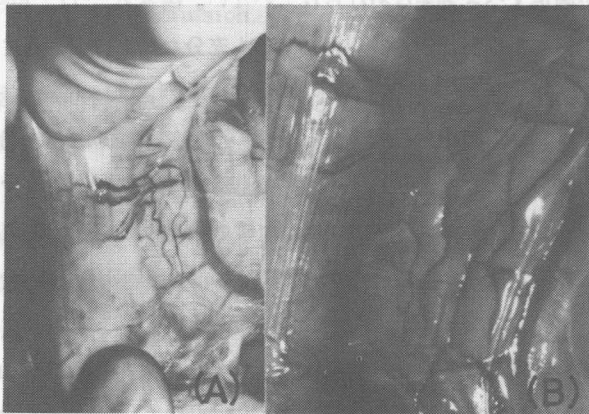


Fig. 54. Photographs of the colon and the mesentery of the dog at immediately after injection of S/O emulsion.

## Ⅲ－２ 小児リンパ管腫に対する治療効果

本研究では、制癌剤にリンパ指向性を与える drug delivery system として、S/O 型エマルジョンを開発したが、臨床、特に外科領域においてはこうした用途以外にも、非常にさまざまな場合にエマルジョンの剤形は適用可能と考えられる。例えば Takahashi<sup>127)</sup> は bleomycin のエマルジョンを皮膚癌等の腫瘍内に直接注入して著効を認めているし、油性造影剤を用いて bleomycin の S/O 型エマルジョンを調製し、リンパ管造影の際同時に化学療法を行なう試みもある。著者もこうした観点から、各種方面への臨床応用の可能性を検討し、京都大学医学部付属病院第二外科学教室と協同して小児リンパ管腫に bleomycin の S/O 型エマルジョンを用いた治療を行ない、多数の有効例を認めたので以下に論述する。

### 2-a bleomycin 含有油中微粒子型エマルジョンの小児リンパ管腫に対する臨床効果

リンパ管腫 (Cystic Hygroma) は血管腫と共に小児に最もしばしば見られる良性腫瘍の一つで、一般に特異な囊腫状の形をとり、その約 ¾ が頸部に発生することが広く認められている。その成因は確定されていないが、胎生期の原始リンパ嚢が発育分化する過程において何らかの理由で異常発育することにより発生すると考えられている。本疾患は良性腫瘍でありながら、あたかも悪性腫瘍のように神経や血管および各種筋群の間を浸潤性に発育する為に、手術的に完全摘出することが困難である場合が多い。また再発や術後のリンパ瘻形成、あるいは感染などを恐れるあまり、過大な根治的切除を強行して、致命的な神経損傷を来すことも少なくない。そこで放射線療法や穿刺療法あるいはヨードホルム等を硬化剤として用いた治療法が試みられているが満足すべき効果はあげられていない。橋本<sup>128)</sup> は、bleomycin を硬化剤として応用し一部に著明な効果を認めたが無効例も多く、必ずしも十分な効果は示されていない。

このような現状に対して、谷川<sup>129)</sup> は前節で論述した家兎に対する bleomycin S/O 型エマルジョン投与による組織学的変化に着目し、本製剤を小児リンパ管腫の治療に用いることを考案した。本研究で使用した S/O 型エマルジョンの調製にあたっては、すべての操作を無菌的に行い、ゴマ油、界面活性剤等も医薬品製造用のものを滅菌して用いた。またゼラチンは、血漿増量剤として臨床に用いられているゼラチン誘導体を滅菌して用いた。臨床で使用したのは、15 mg の bleomycin を S/O 型エマルジョン 1.68 ml に含有した製剤である。

京都大学付属病院第二外科学教室において、本療法を用いて治療した症例は昭和 52 年 7 月から昭和 53 年 12 月までの間に Table 13 に整理した 15 例あり、その内 6 例は bleomycin 水溶液注入療法が無効かまたは効果が不十分であった症例であるが、全例に著しい腫瘍縮小効果を認めた。以下代表的 2 症例について詳述する。

Fig. 55 に示した症例は 4 歳の男子であるが、生下時から左頬部より耳下部にかけて無痛性腫瘤を認め、リンパ管腫と診断された。まず bleomycin 水溶液注入療法を 1 週 1 回の間隔で bleomycin の総量が 20 mg と

Table 13. Location of Cystic Hygromas Received Bleomycin-S/O Emulsion Treatment.

Location	Right	Left	Total
Neck	3	6	9
Axilla	0	2	2
Trunk	1	0	1
Groin	2	0	2
Cheek	0	1	1

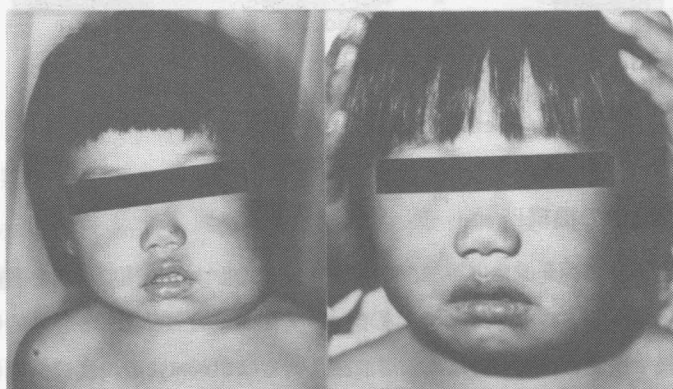


Fig. 55. Case 1. Four year boy prior to (left) and after (right) the treatment with bleomycin-S/O emulsion.

なるまで施行したが明瞭な縮少は得られなかった。そこで、bleomycinのS/O型エマルジョン0.5ml(4.5mg)を4～6週間に1度の割合で4回腫瘍内に注入した結果、腫瘍は急速に縮少し、左顎下部にわずかな硬結を残すのみとなった。なお、その間著明な副作用は認められなかった。

Fig. 56に示した症例は3歳女子で、図のように左腋窩・左前胸部・左側頸部に連続した巨大腫瘍を有していた。bleomycin水溶液注入療法を週1回の割でbleomycinの総量が21mgとなるまで施行したが、満足な腫瘍縮少は認められなかった。そこでエマルジョン療法に変更し、4週間に一度のbleomycinエマルジョン0.4ml(3.6mg)の注入を数回行った結果、腫瘍は著明に縮少するに至った。本症例においても、血液像、胸部X線像その他の理学的検査に異常なく、腫瘍周辺の運動障害なども認められなかった。

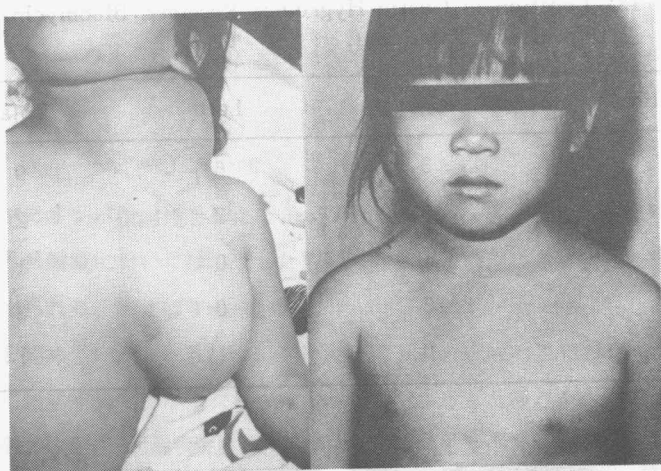


Fig. 56. Case 2. Three year girl prior to (left) and after (right) the treatment with bleomycin-S/O emulsion.

## 2-b リンパ管腫縮少の機構

bleomycin の S/O 型エマルションによって、リンパ管腫が縮少する機構の解明を目的として、家兎の背部皮下に 3mg/kg の bleomycin の水溶液および S/O 型エマルションを注入して、経目的にその組織変化の模様を追求した。注入後 1 週間目においては、水溶液注入例では bleomycin の直接作用により筋肉細胞の核の消失、胞体の好酸性変性、好中球・リンパ球主体のわずかな細胞浸潤像が見られる他に、筋組織の変性を示す灰化筋炎の像が散見された。一方 S/O 型エマルション群では、エマルション滴の存在した部分の周囲に、異物巨細胞をはじめとした組織球系細胞の増生を伴った好中球・リンパ球の炎症性細胞浸潤が水溶液群より著明に認められた。3 週目に至ると、Fig. 57 (a) のように水溶液群では反応部位は膠原線維に置換されており、完成された線維化の像を呈するがその範囲は狭い。これに対して (b) の S/O 型エマルション群では、細胞浸潤は組織球系細胞、リンパ球が主体となった慢性炎症の像を呈し、その周囲の線維芽細胞の増生が目立ち、線維化と肉芽組織の混在した像をとり、その範囲は広く密で、さらに線維化が一層拡大するものと思われる像を呈していた。なお bleomycin を含まない S/O 型エマルションを対照に比較検討すると、その反応性の細胞浸潤および線維化像の程度は bleomycin S/O 型エマルションの方が有意に強いことが明らかとなった。このように、bleomycin S/O 型エマルション投与群では、他の剤形に比べて線維増生、肉芽反応が極めて強く、リンパ管腫の硬化剤としての効果との関連が唆された。

一方、S/O 型エマルションの剤形では、bleomycin が持続的に長時間放出されることが既に確かめられているが、このリンパ管腫内で持続的に放出された bleomycin が直接リンパ管内皮の変性を惹起してその分泌能を抑制することが予想される。こうした効果と上記の bleomycin およびエマルションが組織に対して化学的刺激物として線維化を促す作用の双方が相乗的に作用して、リンパ管腫に対して治療的效果をおよぼし、腫瘍の縮少が得られたものと推察したが、その詳細についてはさらに検討が必要と考えられる。



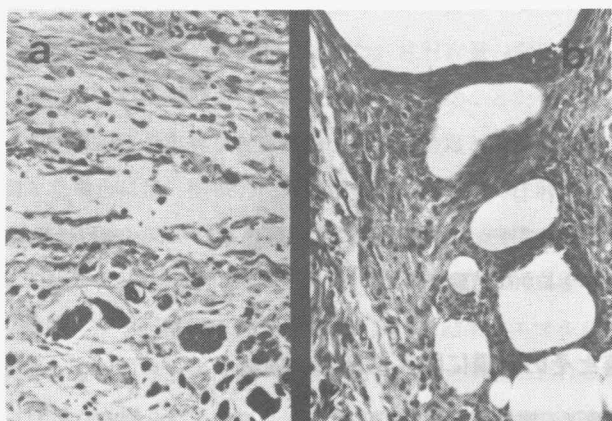


Fig. 57. Microphotographs of the dorsal subcutaneous tissues of the rabbit at three weeks after injection of bleomycin in the form of aqueous solution (a) and S/O emulsion (b).

## 2-c 考 察

小児リンパ管腫の治療に bleomycin の S/O 型エマルジョンの使用を試みた。bleomycin 水溶液注入療法の無効例を含む 15 症例に本療法を施した結果、全例に著しい腫瘍縮小効果を認め、bleomycin の S/O 型エマルジョンの有用性が明らかとなった。また特記すべき副作用も認められず、本製剤の安全性も確かめられた。bleomycin 水溶液有効例においても、S/O 型エマルジョンの方が少ない投与量を投与間隔をあけて投与してもはるかに優れた治療成績が得られることが明らかとなり、患者の受ける肉体的・精神的侵襲の面からも本剤形が有用であることが示された。

bleomycin の S/O 型エマルジョンがリンパ管腫を縮小させる機構については、未だ不明な点が多いが、エマルジョンから持続的に放出された bleomycin によるリンパ管内皮細胞に対する変性効果と製剤全体が化学的刺激物として組織の線維化を促す効果の双方が相乗的に作用していることが予想される。この際にも、第Ⅱ章で論述したエマルジョンの物理化学的性質が効果に寄与しているものと思われる。

以上の結果より、S/O 型エマルジョンがリンパ節転移の防止だけでなく、より広い臨床分野で応用可能であることが示唆された。製剤学的立場から見ても、制癌剤の drug delivery system としての応用が報告されている liposome,<sup>130),131)</sup> polymeric matrix 粒子,<sup>132),133)</sup> albumin microsphere,<sup>134)</sup> あるいは agarose bead<sup>135),136)</sup> などと比較して、エマルジョンは多くの性質の異なった制癌剤に応用可能で剤形としての一般性が高く、また調製時の薬物利用効率にも優れ、将来薬学、医学領域において幅広い応用の可能性を持つ剤形であると考えられる。



## 結 論

以上、著者は3章にわたりエマルジョン注射剤による制癌剤のリンパ移行性改善効果に関して基礎的および応用的研究を行ない次のような結論を得た。

### (I) リンパ移行性改善とその機構に関する基礎的検討

組織間隙における物質輸送の機構を検討し、W/O型エマルジョンを剤形の基本として選択した。さらに安定性などの改善を目的として、W/O型エマルジョンの分散相をゼラチンから成る微粒子としたS/O型エマルジョンを考案した。

一方、これら剤形の効果を客観的・定量的に評価するために、ラットの大腿伸筋および胃壁をモデル注射部位とし、体内をコンパートメントに分けてリンパ移行を総合的にとらえる評価法を確立した。この実験系を用い、モデル薬物 hippuran および制癌剤 5-FU の体内移行に及ぼす剤形の効果を比較した結果、通常用いられる水溶液注射の場合と比べて、S/O型エマルジョンが薬物のリンパ移行性と注射部位滞留性を著しく改善することを証明した。また注射部位による効果の差を比較した結果、リンパ組織の豊富な胃壁においてエマルジョンの効果がより顕著に現れることが明らかとなった。

次に、エマルジョンが制癌剤のリンパ移行を増大させる機構を究明する目的で、エマルジョンの基剤である油脂の移行を追跡した結果、エマルジョン、特にS/O型エマルジョンを注射した後、油脂が注射部位から所属リンパ節へ高濃度に移行することが明らかとなった。さらにS/O型エマルジョン注射後の注射部位および所属リンパ節の組織学的検索より、エマルジョンが再分散して複エマルジョン化した油滴が所属リンパ節に移行していることが確かめられた。これらの知見は、エマルジョンの油滴が運搬体となり制癌剤を直接リンパ系に送り込むことを示すもので所属リンパ節における薬物移行の速度論的解析の結果とも一致した。

### (II) 油中微粒子型エマルジョンの物理化学的性質とリンパ移行増大効果との関連

S/O型エマルジョンの製剤学的特性をW/O型エマルジョンと比較検討した結果、室温放置と凍結のいずれの状態においても前者の方が安定性に優れることが明らかとなった。これはS/O型エマルジョンの分散相がゼラチンゲルより成り、固体粒子的性質を持つため粒子相互の合一が抑制されることに起因すると推論された。一方、両エマルジョンからの5-FUの放出速度を *in vitro* で測定した結果、有意の差は認められなかった。しかし注射後の組織間隙中における存在状態を再現する目的で両エマルジョンをゼラチン水溶液中に再分散させて複エマルジョンを調製し、この状態における5-FUの放出を比較した結果では、S/O型エマルジョンを複エマルジョン化した方が薬物を安定に保持していることが確かめられ、S/O型エマルジョンが制癌剤の運搬体として優れた製剤学的特性を有していることが明らかとなった。

次に、ラットの大腿伸筋をモデル注射部位とし、油脂のリンパ移行を支配する生理学的要因と移行に及ぼす各剤形の物理化学的性質の影響について検討を行った。注射容量の変化あるいは注射部位に対する機械的圧迫によって、エマルションのリンパ移行率が大きく変化したことから、エマルションの油滴のリンパ管への侵入過程において組織内圧の上昇など機械的圧力が駆動力となっていることが示唆された。一方、ゴマ油を単独の形で注射した場合には、機械的圧力の増加により油脂の注射部位近傍組織あるいは循環血流への移行が促進されることが明らかとなり、剤形により油脂の移行機構が異なることが証明された。

次に、剤形の物理化学的性質とリンパ移行性の関連について界面化学的立場からの検討を試み、ゴマ油に界面活性剤を添加して油脂のリンパ移行に対する影響を調べた結果、エマルションの場合と同程度のリンパ移行増大が認められた。また、界面活性剤の添加により、油水界面における界面張力が著しく低下することが証明された。これらの知見より、エマルション調製に用いられた界面活性剤が油水界面の界面張力を下げて組織間隙中における油滴の分散を促進し、ひいてはリンパ移行を増大させることが明らかとなり、注射部位の組織学的検索の結果とも一致した。また、エマルションのリンパ系への移行において、注射部位における分散が律速過程となっていることが明らかとなった。さらに、レオロジーの側面からも注射剤として S/O 型エマルションが優れた特性を有することが示された。

### (Ⅲ) 油中微粒子型エマルションの臨床応用に関する検討

外科手術併用療法における S/O 型エマルションの有用性を明らかにする目的で、家兎の虫垂に VX2 腫瘍を移植してリンパ節転移モデルを作り、外科的に主腫瘍を切除すると同時に、bleomycin S/O 型エマルションを残存虫垂壁に注入して化学療法を行った。この結果、外科手術のみを施して化学療法を行なわなかった群や bleomycin 水溶液を注入した群では、リンパ節転移巣において VX2 腫瘍が増殖していることが組織学的検索により明らかとなったのに対し、S/O 型エマルション群では VX2 腫瘍細胞の崩壊・壊死が認められた。さらに、S/O 型エマルション群では延命効果も認められ、S/O 型エマルションのリンパ節転移防止効果が証明された。また、各剤形投与後の bleomycin の生体内移行を追跡した結果も、こうした事実を裏づけるものであった。

次に、他のリンパ系腫瘍の治療における有用性を検討するため本製剤を小児リンパ管腫の治療に用いた結果、外科療法・放射線療法などを用いても完全な効果が期待できず、また硬化剤として用いた bleomycin 水溶液に対してもほとんど反応を示さない症例において、著明な腫瘍の縮小を認めた。また使用による特別な副作用も認められず、この製剤が安全性の点でも問題なく、小児リンパ管腫の治療に有用であることが明らかとなった。

以上、著者は制癌剤にエマルションを用いた製剤的修飾を施すことによりリンパ移行性を改善できることを明らかにし、最も有用性の高い S/O 型エマルションを開発した。また、組織間隙中からリンパ系への物質の移行を支配する生理学的あるいは物理化学的要因に関しても、興味ある知見を得ることができた。これらの研究結果は、製剤学的手法による制癌剤の drug delivery system 開発、薬物のリンパ系における bioavailability の評価、並びにリンパ移行機構の解明上有益な基礎的知見となり得るものと考えられる。

## 謝

## 辞

終りに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学瀬崎仁教授、ならびに村西昌三助教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、臨床研究に御協力を戴くとともに、種々の有益な御助言と御指導を戴いた京都大学日笠頼則教授、谷川允彦助手に深謝します。さらに種々の有益な御助言と御指導を戴いた大阪薬科大学中元安雄講師ならびに京都大学薬学部薬剤学教室員一同に深謝し、実験の一部に御協力戴いた江川三生修士、高橋嘉輝修士、小嶋拓己修士、吉岡敏夫学士、廖明慧学士に深く感謝致します。

# 実 験 の 部

## 第 I 章 実 験 の 部

### [1] 剤形の選択とリンパ移行実験法

#### (1-a) エマルションの選択と調製法

W/O型エマルションおよびS/O型エマルションは総論の部Table 1に示した処方を用いて調製した。ゴマ油、ゼラチンは局方品を用いた。界面活性剤は、日光ケミカルズ社の sorbitan sesquioleate (SO-15) と硬化ヒマシ油の polyoxyethylene 誘導体 (HCO-60) を用いた。水相として、W/O型エマルションの場合は蒸留水を、S/O型エマルションの場合は20% (W/V) ゼラチン蒸留水溶液を用いた。薬物はあらかじめ水相中に溶かし、SO-15とHCO-60を添加したゴマ油中にこれを超音波振動法を用いて分散させて調製した。乳化は約70℃で5分間行い、さらに0℃付近まで急冷した後2分間行った。乳化は超音波発生器 (No. 5202, 大岳製作所) を用いて、20 KHz, 100 Wで行った。

#### (1-b) ラットを用いたリンパ移行実験法

##### (1) 大腿伸筋内注射実験法

大腿伸筋への注射は kakemi ら<sup>60)</sup> の方法に準じて行った。体重200-240 gのWistar系白色雄性ラットをpentobarbital (45 mg/kg) あるいはエーテル麻酔下、大腿部の皮膚を一部切開し、大腿四頭筋のうち大腿直筋の中央部にマイクロシリンジを用いて注入した。

##### (2) 胃壁内注射実験法

ラットをpentobarbital麻酔下、背位に固定し、腹部正中線にそって開腹後、胃角部前壁側の漿膜下組織に注入した。

##### (3) ラット胸管リンパ採取法

胸管リンパはBollmanらの方法<sup>58)</sup>に若干の改良を加えた方法を用いて採取した。ラットをpentobarbital麻酔下実験台に横位に固定し、左腹部から左背部にかけて剃毛する。剣状突起下約1 cmの所から肋骨弓にそって右側腹部まで皮切し、ついでハサミで開腹する。胸管を露出させた後、heparin (100 unit/ml) を満たしたポリエチレンカニューレ (内径0.5 mm, 外径0.90 mm, Dural Plastics & Eng. Pty 社) を上方から挿入し、瞬間接着剤Aron Alpha A<sup>®</sup> (三共) で固定する。直ちに4号絹糸にて腹筋、皮膚をそれぞれ縫合する。胸管リンパは少量のheparinを含有する試験管中に採取した。

## [2] ラット大腿伸筋に注射後の油脂およびモデル薬物の移行

### (2-a) 油脂の移行

#### (1) 試薬および注射剤の調製

Tripalmitin (carboxyl- $^{14}\text{C}$ ) は New England Nuclear 社のものを用い、これをゴマ油中に  $10\mu\text{Ci/ml}$  の濃度で溶解させたものを用いて各剤形を調製した。S/O型エマルジョンとW/O型エマルジョンは(1-a)と同様の方法で調製した。O/W型エマルジョンは、 $^{14}\text{C}$ -tripalmitin を溶解したゴマ油 0.5 ml を 5 %ゼラチン水溶液 2.0 ml 中に分散させて調製した。乳化は超音波発生器を用い、氷水中で 5 分間行った。

#### (2) 動物実験法

エーテル麻酔下、(1-b)(1)に記述した方法で各剤形を  $50\mu\text{l}$ 、右大腿直筋中央部に注入し、麻酔覚醒後ケージで飼育する。注射後一定時間ごとにラットを殺し、右大腿伸筋、左右の腸骨リンパ節を摘出し、同時に大動脈より採血した。各臓器中の放射活性を測定し、油脂の移行を調べた。

#### (3) $^{14}\text{C}$ -tripalmitin 定量法

$^{14}\text{C}$ -tripalmitin の定量は Mahin と Loftberg の方法<sup>137)</sup>に準じて行った。摘出した筋肉を 5 ml の 1N-NaOH のエタノール溶液中に浸し  $37^\circ\text{C}$  で 24 時間インキュベートして可溶化する。これに 1N-NaOH のエタノール溶液を加えて全量を 10 ml とし、よく攪拌する。この内 0.5 ml を液体シンチレーション測定用のガラスバイアルに入れ、過塩素酸 (60%) 0.2 ml と過酸化水素水 (35%) 0.2 ml を加えて密栓し  $70^\circ\text{C}$  で 90 分間、時々激しく振とうしながら加熱する。冷却後、ethylene glycol-monoethyl ether 500 ml, toluene 1000 ml, および 2,5-diphenyloxazole 6 g を混合した液体シンチレーション用メディウムを 15 ml 加え、放射活性を liquid scintillation counter (Beckman LS-232) を用いて測定した。クエンチングの補正は外部標準法により行った。リンパ節は重量を測定後全量をバイアルに入れ、また血液は 0.2 ml をバイアルに採取し、筋肉可溶化液と同様の方法で放射活性を測定した。

### (2-b) モデル薬物の移行

#### (1) 試薬および注射剤の調製

Sodium o-iodo hippurate ( $^{131}\text{I}$ ) は Dainabot 社が腎シンチグラム用に調製した Radio-Hippuran<sup>®</sup> を用いた。本注射液の放射能濃度は  $500\mu\text{Ci/ml}$  で Sodium bicarbonate 2 mg/ml, Sodium citrate 2 mg/ml, および benzyl alcohol 0.9% (V/V) を含む溶液である。S/O型エマルジョンとW/O型エマルジョンの調製は、内相としてこの溶液をそのまま用い、(1-a)と同様の方法で行った。水溶液注射には、この溶液を同じ組成の溶媒で希釈して用いた。

#### (2) 動物実験法

大腿伸筋に注射後のリンパ節および血液中濃度の測定は、(2-a)(2)と同様の実験方法を用いて行った。大腿伸筋からの消失は、Kakemi ら<sup>60)</sup>の方法に従って行った。エーテル麻酔下、大腿四頭伸筋を皮下組織、大臀筋から分離し、その両端に縫合糸を結紮できるように通しておく。注射一定時間後に縫合糸で結紮して血液を止めた後、直ちに筋両端を切断して筋肉を摘出し放射活性を測定した。静脈内注射はエーテル麻酔下、大腿静脈に行った。

### (3) hippuran 定量法

摘出した大腿伸筋はポリエチレン管（直径 12mm）に入れ、Well 型  $\gamma$  線 scintillation counter（Model ATS-621，富士通）で放射活性を測定した。血液は 0.5ml を採取し、またリンパ節は重量を測定した後、それぞれポリエチレン管に入れ同様の方法で測定した。

### (2-c) 組織学的検索

摘出した大腿伸筋およびリンパ節の凍結切片を電子凍結式冷凍マイクローム（EMF-A，小松エレクトロニクス）を用いて作製し、顕微鏡で観察した。

## [3] ラット胃壁に注射後の油脂およびモデル薬物の移行

### (3-a) 油脂の移行

#### (1) 注射剤調製法

注射剤の調製は (2-a)(1) と同様の方法で行った。

#### (2) 動物実験法

(1-b)(2) に記述した方法で各剤形 20  $\mu$ l をラット胃壁に注入した。一定時間後、ラットを殺し、胃、門脈リンパ節と後胃リンパ節を摘出すると共に、血液を大動脈より採取した。胸管リンパ中移行は、(1-b)(3) に記述した手術操作を施したラットを用いて測定した。

### (3) $^{14}\text{C}$ -tripalmitin 定量法

摘出した胃中の放射活性は、(2-a)(3) に記述した大腿伸筋の場合と同様の方法で定量し、血液中、リンパ節中濃度も (2-a)(3) と同様に測定した。胸管リンパ液中濃度は、リンパ液量を測定後 0.2ml を採取し、1N HCl を 0.1ml 加えた後液体シンチレーション用メディウムを加えて放射活性を測定した。

### (3-b) モデル薬物の移行

#### (1) 注射剤調製法

注射剤の調製は (2-b)(1) と同様の方法で行った。

#### (2) 動物実験法

注射容量を 40  $\mu$ l とし、他は (3-a)(2) と同様の方法で行った。

### (3) hippuran 定量法

胃、リンパ節、血液中の hippuran の定量は、(2-b)(3) と同様の方法で行った。胸管リンパ液は容量を測定後、全量をポリエチレン管に移し、放射活性を測定した。

### (3-c) 薬物のリンパ節における動態

所属リンパ節における AUC は、面積を台形に区切り、幾何学計算により求めた。胸管リンパ中総回収量は、濃度と容量より計算で求めた。

#### [4] 油中微粒子型エマルジョンによる 5-fluoro uracil のリンパ移行性改善

##### (4-a) 大腿伸筋に注射後の移行

###### (1) 試薬および注射剤調製法

5-FUは協和醸酵工業より供与されたものを用い、5-fluoro [6- $^3\text{H}$ ] uracilは Radiochemical Centre社のものを用いた。S/O型エマルジョンとW/O型エマルジョンは(1-a)に記述した方法で調製し、その際5-FUのエマルジョン中濃度が2.5 mg/mlの濃度になるようにした。5-FUの水溶液注射剤は、5-FUを蒸留水中に2.5 mg/mlの濃度に溶解させて調製した。 $^3\text{H}$ -5-FUは10  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ の比放射活性になるように無標識の5-FUで希釈した後、各剤形を調製した。

###### (2) 動物実験法

(2-b)(2)に記述した方法を用いて実験を行った。注射容量は40  $\mu\text{l}$ とした。

###### (3) 5-FU定量法

摘出した大腿伸筋とリンパ節中の $^3\text{H}$ -5-FUの放射活性の測定は、(2-a)(3)と同様の方法で行った。無標識の5-FUの定量は、Staphylococcus aureus 209Pを検定菌とし、disc-plate法を用いたbioassayにより行った。血液は採取後直ちに遠心分離にかけ、plasma中の抗菌活性を測定した。濃度は検量線を用いて計算した。

##### (4-b) 胃壁に注射後の移行

###### (1) 注射剤調製法

注射剤の調製は(4-a)(1)と同様の方法で行った。

###### (2) 動物実験法

(3-a)(2)と同様に実験を行った。注射容量は40  $\mu\text{l}$ とした。

###### (3) 5-FU定量法

摘出した胃および所属リンパ節中の $^3\text{H}$ -5-FUの定量は(2-a)(3)と同様の方法で行った。plasma中抗菌活性は(4-a)(3)と同様の方法で測定した。胸管リンパは容量を測定した後、そのままbioassayを行った。

##### (4-c) 代謝に対する影響

胸管リンパおよびplasma中の放射活性は、(3-a)(3)と同様に測定した。所属リンパ節中の抗菌活性の測定は、5匹分のリンパ節を摘出後一つに集め、重量を測定後pH 7.4等張リンパ酸緩衝液を加えてホモジナイズし、2800 r.p.m.で遠心分離後上清をbioassayして行った。

## 第Ⅱ章 実験の部

### 〔1〕油中微粒子型エマルションの製剤学的特性

#### （1-a）粒度分布および安定性

##### （1）粒度分布測定法

エマルションをスライドグラス上にとり、カバーグラスでおおったのち、顕微鏡写真にとり、一定の大きさに拡大した。この写真より各粒子の大きさを測定し、粒度分布および平均粒子径を求めた。

##### （2）安定性試験法

S/O型エマルションとW/O型エマルションを3検体ずつ調製し、それぞれ内径6mmで一端を封じた清浄なガラス円柱内に高さが8cmとなるように充てんした後上端を封じて垂直に保持した。この状態で室温中に放置し、経時的に各相の高さを測定した。

冷凍保存における安定性は、3検体ずつ調製したS/O型エマルションとW/O型エマルション2.5mlを内径8mmの試料びんに充てんした後-20℃の冷凍庫中に保存し、一月後に室温中で解凍してエマルションの復元性を観察し、比較した。

#### （1-b）薬物放出速度

##### （1）放出速度測定法

エマルションからの薬物の放出速度は、総論の部Fig.34に示した装置を用いて測定した。上室には試料を入れ、下室は蒸留水を満たした。また隔膜としてセルロース膜（Visking社、36/32）を用いた。装置全体は37℃の恒温槽（富山産業、マグスターパス）中に浸し、下室はマグネットスターラーで攪拌した。放出実験中下室より0.5mlを採取し、同時に37℃に加温した蒸留水を同量補充した。

##### （2）5-FU定量法

試料液0.5mlを液体シンチレーション用ガラスバイアルに入れ、実験の部第Ⅰ章（2-a）(3)に記述したシンチレーションメディウム15mlを加えて放射活性を測定した。

### 〔2〕油脂のリンパ移行に及ぼす剤形の物理化学的性質の影響

#### （2-a）油脂の移行に及ぼす注射容量の影響

##### （1）<sup>14</sup>C-tripalmitinの移行測定法

<sup>14</sup>C-tripalmitinを溶解した各注射剤を実験の部第Ⅰ章（2-a）(1)と同様に調製し、実験の部第Ⅰ章（2-a）(2),(3)と同様に実験を行った。その際、注射容量を10 $\mu$ lから50 $\mu$ lまで変化させた。また移行は注射6時間後の値で比較した。



## (2) sudan blue の移行測定法

ゴマ油に sudan blue を 3 mg/ml の濃度に溶かし、これを 10 $\mu$ l あるいは 50 $\mu$ l 実験の部第 1 章 (1-b) (1) のように大腿伸筋に注射した後、経時的に大腿伸筋を摘出し、残存する sudan blue の量を定量すると共に、色素の移行を肉眼的に追跡した。定量は、摘出した筋肉を蒸留水を加えてホモジナイズし、全量を 20 ml とした後、NaCl 7 g と benzene 10 ml を加えて 30 分振とうし、2800 r.p.m. で遠心分離後 benzene 層の 645 nm における吸光度を測定して行った。

## (3) $^{14}$ C-tripalmitin の分布測定法

$^{14}$ C-tripalmitin を 30  $\mu$ Ci/ml の濃度でゴマ油中に溶解し、これを 50 $\mu$ l エーテル麻酔下ラットの大腿伸筋に注射した後、デシケータを利用した代謝ケージ中に飼育する。注射 6 時間後にラットを殺し、各臓器を摘出して重量を測定した後、実験の部第 1 章 (2-a) (3) と同様の方法で臓器中放射活性を測定した。呼吸中  $^{14}$ CO<sub>2</sub> は 2N-NaOH 中に捕集し、この内 0.5 ml を採取して放射活性を測定した。

## (2-b) 注射部位の機械的圧迫の影響

実験の部第 1 章 (1-b) (1) に準じて大腿伸筋に  $^{14}$ C-tripalmitin を含むゴマ油および S/O 型エマルジョン 10 $\mu$ l を注射後、5 分間軽く大腿伸筋をマッサージし、ケージで飼育する。6 時間後にラットを殺し、大腿伸筋および所属リンパ節中の放射活性を実験の部第 1 章 (2-a) (3) に準じて測定した。

## (2-c) 油脂の移行と物理化学的性質との関連

### (1) 動物実験法

$^{14}$ C-tripalmitin を溶かしたゴマ油に、HCO-60 および SO-15 をそれぞれ 1.7% (V/V)、6.7% (V/V) の割合で添加し、注射容量を変えて大腿伸筋に実験の部第 1 章 (1-b) (1) と同様の方法で注射し、6 時間後の  $^{14}$ C-tripalmitin の移行を実験の部第 1 章 (2-a) (3) と同様の方法で測定した。

### (2) 表面張力および界面張力測定法

表面張力および界面張力の測定には Du Nouy 型の張力計 (島津製作所) を用い、輪環法で測定した。測定は 25℃ の恒温室中で行った。

### (3) 粘度測定法

粘度は、コーンプレート型粘度計 (HAAKE 社製, Rotovisko<sup>®</sup>) を用い、25℃ の恒温室中で測定した。

### (4) 組織学的検索

実験の部第 1 章 (2-c) と同様の方法で行った。

## 第Ⅲ章 実験の部

### [1] 家兔リンパ節転移モデルに対する治療効果

#### (1-a) リンパ節転移モデル作製法および実験法

##### (1) リンパ節転移モデル作製法

実験には体重 2.0～3.2 kg の雄性白色家兔を用いた。VX2 腫瘍は 4 週間間隔で大腿筋肉内に継代移植を続けたものを用いた。この間、腫瘍の自然退縮は全く認められなかった。家兔の大腿筋肉内に移植発育させた VX2 癌を 4 週間後に摘出し、壊死部を除去した後腫瘍組織 1 g につき Hanks 液 10 ml を加えて、鋭剪刀にて細切、4 枚ガーゼで汙過した後、800 r.p.m. で 5 分間遠心分離を行った。上清を除去した後、沈殿した腫瘍細胞の容積比を Hanks 液で調節して 20% とし、腫瘍細胞浮遊液を調製した。調製した浮遊液は約  $5 \times 10^6$  個/ml の割合で腫瘍細胞を含んでいた。pentobarbital 麻酔下に開腹し、虫垂体部に調製した VX2 細胞浮遊液 0.3 ml を注入移植した。10 日後に再開腹術を施行して、腫瘍を含めて、虫垂の尾側半切除術を行うと同時に、残存する中枢側虫垂壁内へ bleomycin の各種剤形による局所療法を施行し、全身療法を施行した群も含めて、その効果を比較した。治療は次の 4 群に分けて行った。(1) bleomycin 3 mg/kg を S/O 型エマルションとして残存虫垂壁内へ注入した群。(2) 同量の bleomycin を水溶液として残存虫垂壁内へ注入した群。(3) 同量の bleomycin を水溶液として耳静脈内へ注入した群。(4) 外科手術のみで化学療法を施行しなかった群。

各群 2 羽を治療後 1, 2, 3, 4, 5 週目に再開腹して、所属リンパ節転移巣の変化を組織学的に検討した。又、各群数羽づつを生存期間の比較の為に追跡調査に供した。

##### (2) 試薬および注射剤調製法

bleomycin は、日本化薬より供与された、bleomycin hydrochloride を用いた。MCT-8 は日清製油のものを用いた。S/O 型エマルションおよび W/O 型エマルションの調製は、実験の部第 I 章 (1-a) (1) と同様の方法で行った。この際、エマルション中の bleomycin 濃度が、8.9 mg (力価)/ml となるように調製した。bleomycin の水溶液は、bleomycin を注射用蒸留水中に溶解させ濃度を 8.9 mg/ml としたのものを用いた。bleomycin の油性懸濁液は日本化薬より提供されたものを用いた。これは bleomycin 15 mg を、ゴマ油 1 ml 中にアルミニウムモノステアレート 10 mg を加えた後加熱処理を施して調製した油ゲル中に分散させたものである。

#### (1-b) bleomycin の生体内移行

##### (1) 動物実験法

正常家兔の虫垂壁に各種剤形を用いて 3 mg/kg の投与後、一定時間後に家兔を殺し、虫垂、所属リンパ節、

肺、肝臓を摘出すると共に、耳静脈より採血し、各臓器中の bleomycin 濃度を測定した。水溶液を静脈内注入した場合も、同様の実験を行った。担癌家兎の場合は、虫垂切除手術と同時に S/O 型エマルジョンを注入し、同様に実験を行った。

## (2) bleomycin 定量法

bleomycin の定量は、*Bacillus subtilis* PCI-219 を検定菌とする bioassay により行った。各濃度は検量線を用いて計算した。虫垂、リンパ節、肺、肝臓はそれぞれ重量を測った後、pH 7.4 の等張リン酸緩衝液を加えてホモジナイズし、2,800 r.p.m. で 5 分間遠心分離をして上清を定量に用いた。

## (1-c) リンパ節転移に対する抗腫瘍効果

Bleomycin を各剤形を用いて注入後、経時的にリンパ節を摘出し、10%ホルマリン固定、パラフィン包埋後、常法に従って切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い、組織学的検討により抗腫瘍効果を比較した。延命効果は生存日数を記録し、各群の平均生存日数より評価した。

## [2] 小児リンパ管腫に対する治療効果

bleomycin を含有した臨床治験用 S/O 型エマルジョンは、実験の部第 1 章 (1-a) に記述した方法に準じて調製した。調製操作はクリーンベンチ内で行い、器具などは全てオートクレーブで滅菌したものを用いた。油脂は注射剤用ゴマ油に SO-15 (6.7%) と HCO-60 (1.7%) を添加し、さらに benzyl alcohol を 1% の割合で添加した後、8, 3, および  $0.3\mu\text{m}$  の三段階で汙過したものをアンプル中に  $\text{N}_2$  ガス置換下充てんし、エマルジョン調製時に開封して用いた。ゼラチンは、東洋醸造社より低分子ゼラチンのサクシニル化体 (ゲラフシン<sup>®</sup> 原末) の提係を受け、 $0.22\mu\text{m}$  で汙過滅菌後用いた。

## 引用文献

- 1) G. Zografi and J. R. Robinson, *Amer. J. Pharm. Edu.*, **38**, 9, 1974.
- 2) T. Higuchi and V. Stella, "Pro-Drugs as Novel Delivery System," American Chemical Society, Washington, D. C., 1975.
- 3) 瀬崎仁, *ファルマシア*, **11**, 196, 1975.
- 4) G. Gregoliadis, *Nature*, **265**, 407, 1977.
- 5) C. T. Klopp, J. C. Alford, J. Bateman, G. N. Berry, and T. Winship, *Ann. Surg.*, **132**, 811, 1950.
- 6) R. E. Johnson, *Cancer*, **35**, 1, 1975.
- 7) 河村謙二, 橋本勇, *最新医学*, **19**, 2345, 1964.
- 8) G. Kitchen and M. J. Garrett, *Clin. Radiol.*, **22**, 379, 1971.
- 9) I. M. Ariel and M. I. Resnick, *Surgery*, **55**, 355, 1964.
- 10) J. M. Yoffey and F. C. Courtice, "Lymphatics, Lymph, and the Lymphomyeloid Complex," Academic Press, London, 1971.
- 11) R. K. Ockner and K. J. Isselbacher, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **71**, 107, 1974.
- 12) P. M. Daniel, O. E. Pratt, I. M. Roitt, and G. Torrigiani, *Quart. J. exp. Physiol.*, **52**, 184, 1967.
- 13) A. F. Lever and W. S. Peart, *J. Physiol.*, **160**, 548, 1962.
- 14) E. V. Flock and J. L. Bollman, *J. Biol. Chem.*, **185**, 903, 1950.
- 15) A. E. Dumond and J. H. Mulholland, *Gastroenterology*, **38**, 954, 1960.
- 16) A. Lithander, B. Werner, and L. O. Forsgren, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy—1968*, 366, 1969.
- 17) 長谷川真常, 神田静人, 保田隆, 滝秀雄, 渡辺泰雄, *化学療法*, **26**, 459, 1978.
- 18) T. Noguchi, Y. Jinguji, T. Kimura, S. Muranishi, and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 782, 1975.
- 19) S. M. Sieber, V. H. Cohn, and W. T. Wynn, *Xenobiotica*, **4**, 265, 1974.
- 20) R. R. Bruns and G. E. Palade, *J. Cell. Biol.*, **37**, 244, 1968.
- 21) D. G. Garlick and E. M. Renkin, *Amer. J. Physiol.*, **219**, 1595, 1970.
- 22) E. M. Renkin and D. G. Garlick, *Microvasc. Res.*, **2**, 392, 1970.
- 23) R. R. Bruns and G. E. Palade, *J. Cell. Biol.*, **37**, 277, 1968.
- 24) N. Simionesco and G. E. Palade, *J. Cell. Biol.*, **50**, 616, 1971.
- 25) L. V. Leak, *J. Cell. Biol.*, **50**, 300, 1971.
- 26) L. V. Leak, *Fed. Proc.*, **35**, 1863, 1976.

- 27) R. E. Gosselin and L. F. Audino, *Pflügers Arch.*, **322**, 197, 1971.
- 28) B. E. Ballard, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 357, 1968.
- 29) S. Yamada, *Nagoya Med. J.*, **5**, 81, 1959.
- 30) K. Satomura, N. Tanigawa, and S. Magari, *Surg. Gynecol. Obstet.*, **146**, 415, 1978.
- 31) S. Prasasvinichai, T. Honda, A. Nedwich, S. Lam, and L. W. Brady, *Radiol. Clin. Biol.*, **42**, 460, 1973.
- 32) G. Szabó, Z. Magyar, and G. Molnár, *Lymphology*, **6**, 69, 1973.
- 33) F. J. Sanen and L. K. Thompson, *Radiology*, **78**, 450, 1966.
- 34) L. K. Thompson, J. W. Futrell, and W. G. Anlyan, *Plastic Reconst. Surg.*, **37**, 125, 1966.
- 35) 関口慶二, *材料*, **21**, 502, 1972.
- 36) A. N. Martin, J. Swarbrick and A. Commarata, "Physical Pharmacy, 2nd Ed., Chap. 19," Lea & Febiger, 1969.
- 37) 村西昌三, 橘田充, 瀬崎仁, *医学のあゆみ*, **199**, 745, 1976.
- 38) E. Managold, *Kolloid-Z.*, **85**, 186, 1939.
- 39) 藤田浩, "癌化学療法の基礎と臨床, V 抗癌剤の吸収・排泄・分布・代謝", 癌と化学療法社, 1977.
- 40) E. B. Reeve and A. C. Guyton, "Physical Bases of Circulatory Transport, Chapt., 11, Long-term Regulation of the Circulation: interrelationships with body fluid volumes," Sarenders Philadelphia, 1967.
- 41) A. E. Taylor, W. H. Gibson, H. J. Granger and A. C. Guyton, *Lymphology*, **6**, 1, 1973.
- 42) C. A. Wiederhielm, *J. Gen. Physiol.*, **52**, 29, 1968.
- 43) G. Wooley, 入沢宏, *代謝*, **9**, 586, 1972.
- 44) 忽邦将愛, "日本人のリンパ系解剖学", 金原出版, 1968.
- 45) A. Engeset, B. Hager, A. Nesheim, and A. Kolbenstvedt, *Lymphology*, **6**, 1, 1973.
- 46) J. B. Smith, G. H. McIntosh, and B. Morris, *J. Anat.*, **107**, 87, 1970.
- 47) W. L. Goyner, R. D. Carter, and E. M. Renkin, *Lymphology*, **6**, 181, 1973.
- 48) S. Jacobsson and I. Kjellmer, *Acta Physiol. Scand.*, **60**, 286, 1964.
- 49) C. Bach and G. P. Lewis, *J. Physiol.*, **235**, 477, 1973.
- 50) T. De Marco and R. R. Levine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **169**, 142, 1969.
- 51) Y. Nakamoto, M. Fujiwara, T. Noguchi, T. Kimura, S. Muranishi, and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2232, 1975.
- 52) Y. Nakamoto, M. Hashida, S. Muranishi and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3125, 1975.
- 53) A. A. Ismail, M. S. ElRidi, A. Abdel Hay, G. Kamel, M. Talaat, and K. I. Fayek, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **31**, 321, 1967.
- 54) P. Acred, D. M. Brown, B. F. Clark, and L. Mizen, *Br. J. Pharmac.*, **39**, 439, 1970.
- 55) T. T. Job, *Anat. Rec.*, **9**, 447, 1915.

- 56) N. L. Tilney, *J. Anat.*, **109**, 369, 1971.
- 57) T. Saldeen and E. Linder, *Acta Path.*, **49**, 433, 1960.
- 58) J. L. Bollman, J. C. Cain, and J. H. Grindlay, *J. Clin. Med.*, **33**, 1349, 1948.
- 59) R. B. Sund and J. Schou, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **21**, 313, 1964.
- 60) K. Kakemi, H. Sezaki, K. Okumura, and S. Ashida, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1332, 1969.
- 61) H. Kobayashi, T. Nishimura, K. Okumura, S. Muranishi, and H. Sezaki, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 580, 1974.
- 62) M. Hashida, M. Egawa, S. Muranishi, and H. Sezaki, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**, 225, 1977.
- 63) R. Deanesly and A. S. Parkes, *J. Physiol.*, **78**, 155, 1933.
- 64) W. E. Brown, V. M. Wilder and P. Schwariz, *J. Lab. Clin. Med.*, **29**, 259, 1944.
- 65) T. Tanaka, H. Kobayashi, K. Okumura, S. Muranishi and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 1275, 1974.
- 66) J. N. Bollinger, *J. Pharm. Sci.*, **59**, 1084, 1970.
- 67) M. Tubis, E. Posnick, and R. A. Nordyke, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **103**, 497, 1960.
- 68) 中里博昭, 手術, **30**, 127, 1978.
- 69) M. Hashida, Y. Takahashi, S. Muranishi, and H. Sezaki, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**, 241, 1977.
- 70) W. Bloom and D. W. Fawcett, "Textbook of Histology 10th. Ed.", W. B. Saunders Co., 1973.
- 71) R. Virchow, "Cellular Pathology," Trans. from 2nd German Edition by Frank Chance, Robert Mode Witt, New York.
- 72) J. Ludwig, *Lymphology*, **4**, 18, 1971.
- 73) J. Ludwig, *Lymphology*, **5**, 148, 1972.
- 74) C. K. Drinker, M. E. Field, and H. K. Ward, *J. exp. Med.*, **59**, 393, 1934.
- 75) J. G. Hall and B. Morris, *Q. J. exp. Physiol.*, **48**, 235, 1973.
- 76) I. Zeidman and J. M. Buss, *Cancer Res.*, **14**, 403, 1954.
- 77) J. Ludwig and J. L. Titus, *Arch. Path.*, **84**, 304, 1967.
- 78) J. J. P. deLima, P. Alantara, and D. S. Garcia, *Lymphology*, **6**, 169, 1973.
- 79) 谷川允彦, 日本外科宝函, **47**, 563, 1978.
- 80) M. S. Sheppard and E. E. Sterns, *Surg. Gynecol. Obstet.*, **140**, 405, 1975.
- 81) R. Duschinsky and E. Plevin, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4559, 1957.
- 82) C. Heidelberger, L. Griesback, B. J. Montag, D. Mooren, O. Cruz, R. J. Schnitzer, and E. Grunberg, *Cancer Res.*, **18**, 305, 1958.
- 83) M. Hashida, S. Muranishi, and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2410, 1977.
- 84) J. J. Windheuser, J. L. Sutter, and E. Aven, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 301, 1972.
- 85) L. B. Mellett, *Cancer Treat. Rep.*, **61**, 527, 1977.

- 86) E. R. Garrett, G. H. Hurst, and J. r. Green, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1422, 1977.
- 87) W. Sadee and C. G. Wong, *Clin. Pharmacokin.*, **2**, 437, 1977.
- 88) B. Clarkson, A. O'Connor, L. Winston, and D. Hutchison, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **5**, 581, 1965.
- 89) C. Hurst, E. R. Garrett, and P. H. Hinderling, "Abstracts of Papers, 19th National Meeting of APhA Academy of Pharmaceutical Sciences, Atlanta, November, 1975," p. 119.
- 90) K. Yamada, E. D. Holyoke, and H. O. Douglass, *Amer. J. Surg.*, **131**, 253, 1976.
- 91) K. Kikuchi, Y. Aneha, H. Kanno, Y. Kunii, K. Hirata, and J. Ohta, *J. Jap. Soc. Cancer Ther.*, **11**, 519, 1976.
- 92) M. Thomas, *Br. J. Cancer*, **37**, 105, 1978.
- 93) H. S. Shunkla, L. E. Hughes, P. W. Davis, R. H. Whitehead, and K. G. Leach, *Amer. J. Surg.*, **133**, 346, 1977.
- 94) J. Freund and K. McDermatt., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **49**, 548, 1942.
- 95) S. S. Davis, *J. Hospital Pharm.*, **32**, 149, 1974.
- 96) R. P. Geyer, *New Engl. J. Med.*, **289**, 1077, 1973.
- 97) C. J. Benoy, R. Schneider, L. A. Elson, and M. Jones, *Europ. J. Cancer*, **10**, 27, 1974.
- 98) S. S. Davis, *J. Clin. Pharm.*, **1**, 11, 1976.
- 99) P. Becher "Emulsions: Theory and Practice," Reinhold Publishing Co., New York, 1957.
- 100) 高村彰, 野呂俊一, 小石真純, "エマルションに関する研究・技術データ集", 科学汎論社, 1977.
- 101) W. G. Barb and W. Mikuki, *J. Polymer Sci.*, **37**, 499, 1959.
- 102) A. Buzagh and R. Rohrsetzer, *Kolloid-Z.*, **176**, 9, 1961.
- 103) T. Koizumi and W. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 87, 1968.
- 104) 竹原光教, 小池満, *薬学雑誌*, **97**, 780, 1977.
- 105) A. F. Brodin, D. R. Kavaliunas, and S. G. Frank, *Acta Pharm. Scand.*, **15**, 1, 1978.
- 106) Y. Kumano, A. Nakamura, S. Tahara, and S. Ohta, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **28**, 285, 1977.
- 107) D. S. Goldman, I. L. Chaikoff, W. O. Reinhardt, C. Entenman, and W. G. Dauben, *J. Biol. Chem.*, **184**, 727, 1950.
- 108) J. H. Lewis, *J. Amer. Med. Assoc.*, **76**, 1342, 1921.
- 109) L. W. Shaffer, *Arch. Dermatol.*, **19**, 347, 1929.
- 110) 草間悟, *胃と腸*, **12**, 61, 1977.
- 111) 谷川允彦, *日本外科宝函*, **47**, 585, 1978.
- 112) M. Hashida, S. Muranishi, H. Sezaki, N. Tanigawa, K. Satomura, and Y. Hikasa, *Int. J. Pharm.*, **2**, 1979, in press.
- 113) S. Tsukagoshi and Y. Sakurai, *Cancer Chemother. Rep.*, **54**, 311, 1970.

- 114) 徳山英太郎, 外科治療, **6**, 50, 1962.
- 115) I. Zeidman, *Cancer Res.*, **25**, 324, 1965.
- 116) V. Engzell, C. Rubio, B. Tjernberg, and J. Zajicek, *Europ. L. Cancer*, **4**, 305, 1968.
- 117) 井上一正, 日本外科宝函, **46**, 434, 1977.
- 118) N. J. Greenberger and T. G. Skillman, *New Eng. J. Med.*, **280**, 1045, 1969.
- 119) D. Sailer and G. Berg, *Fette Seifen Anstrichmit.*, **79**, 143, 1977.
- 120) 安部史紀, 坪崎正寿, 田中建志, 加藤仁紀, 吉岡修, 松田明, *Jap. J. Antibiotic.*, **29**, 826, 1976.
- 121) 浦野宗保, 小池幸子, 安藤興一, 根住直史, 鈴木康夫, *Jap. J. Antibiotic.*, **29**, 721, 1976.
- 122) 田中建志, 山賀哲男, 一町田裕子, 吉岡修, 松田明, *Jap. J. Antibiotic.*, **29**, 894, 1976.
- 123) H. Umezawa, M. Ishizuka, K. Maeda, and T. Takeuchi, *Cancer*, **20**, 891, 1967.
- 124) T. Ohnuma, J. F. Holland, H. Masuda, J. A. Waligunda, and G. A. Goldberg, *Cancer*, **33**, 1230, 1974.
- 125) 高橋俊雄, 水野光邦, 渡辺信介, 河野研一, 外科診療, **15**, 1064, 1973.
- 126) 高橋俊雄, 藤田佳宏, 咲田雅一, 福島正則, 間島進, 手術, **28**, 599, 1974.
- 127) T. Takahashi, S. Ueda, K. Kono, and S. Majima, *Cancer*, **38**, 1507, 1976.
- 128) 橋本俊, 由良二郎, 鶴賀信篤, 高橋英城, 水野孝, 日小外誌, **11**, 239, 1975.
- 129) 谷川允彦, 里村紀作, 田中紘一, 村西昌三, 橋田充, 外科治療, **39**, 419, 1978.
- 130) A. W. Segal, G. Gregoriadis, and C. D. Black, *Clin. Sci. Mol. Med.*, **49**, 99, 1975.
- 131) E. Arakawa, Y. Imai, H. Kobayashi, K. Okumura, and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2218, 1975.
- 132) S. Yolles, T. D. Leafe, and F. J. Meyer, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 115, 1975.
- 133) S. Yolles, T. D. Leafe, L. Ward, and F. Boettner, *Bull. Parent. Drug Assoc.*, **30**, 306, 1976.
- 134) P. A. Kramer, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1646, 1974.
- 135) T. Kojima, M. Hashida, S. Muranishi, and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1818, 1978.
- 136) M. Hashida, T. Kojima, S. Muranishi, and H. Sezaki, *Gann*, **69**, 839, 1978.
- 137) D. T. Mahin and R. T. Loftbern, *Anal. Biochem.*, **16**, 500, 1966.